



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANILO SOARES COSTA

**BIOCONJUGAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM SEQUÊNCIAS
IMUNOGÊNICAS DE NS1 ORIUNDAS DOS VÍRUS DENGUE TIPO I, II,
III E IV**

VITÓRIA, ES

2017

DANILO SOARES COSTA

**BIOCONJUGAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM SEQUÊNCIAS
IMUNOGÊNICAS DE NS1 ORIUNDAS DOS VÍRUS DENGUE TIPO I, II,
III E IV**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Cesar
Cunegundes Guimarães

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

C838b Costa, Danilo Soares, 1988 -
Bioconjugação de nanopartículas de ouro com peptídeos sintéticos
baseados em sequências imunogênicas de ns1 oriundas dos vírus
dengue tipo I, II, III e IV / Danilo Soares Costa – 2017.
75 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Anticorpos. 2. Biotecnologia. I. Guimarães, Marco Cesar Cunegundes.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.
Título.

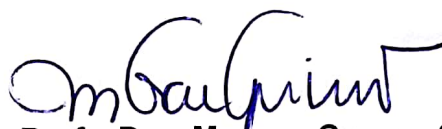
CDU: 61

DANILO SOARES COSTA

**BIOCONJUGAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM SEQUÊNCIAS
IMUNOGÊNICAS DE NS1 ORIUNDAS DOS VÍRUS DENGUE TIPO I, II,
III E IV**

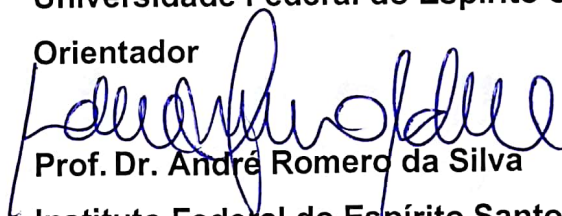
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 31 de Agosto de 2017.



**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes
Guimarães**

**Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador**



**Prof. Dr. André Romero da Silva
Instituto Federal do Espírito Santo**



**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo**

VITÓRIA, ES

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e amigos no reconhecimento de que sem eles este trabalho não
teria sido realizado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães, pela paciência e apoio.

Aos Professores André Romero da Silva e Breno Valentim Nogueira por aceitarem estar nessa banca e por se disporem a contribuir com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFES, pela oportunidade concedida neste centro de pesquisa e pelos encontros acadêmicos cuidadosamente preparados.

Aos meus prezados amigos, Jairo, Wanderson, Afrânio, Beto Contreras, Gabriel, Tadeu, Rodolfo, Gabriela, Suely, Rayssa “*Harper*”, Raissa Debacker pelas preocupações sinceras, pela sempre boa vontade de ajudar, por compartilharem as apreensões e o conhecimento de um modo espontâneo e agradável.

À minha amada família pelo amor, incentivo e alento incondicionais, pelo suporte material e emocional sobretudo nos momentos que cogitei desistir. Obrigado por sua persistência!

Todos juntos dão prova de que é impossível lograr êxito sozinho.

EPÍGRAFE

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o
homem que adquire conhecimento”. (Provérbios 3:13)*

RESUMO

COSTA, D.S. **Bioconjugação de nanopartículas de ouro com peptídeos sintéticos baseados em sequências imunogênicas de NS1 oriundas dos vírus dengue tipo I, II, III e IV.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Recentemente, nanocarreadores constituídos de peptídeos sintéticos conjugados com nanopartículas de ouro (AuNP) têm sido considerados uma plataforma eficiente para a entrega de imunógenos e consequente produção de anticorpos. Apesar de as nanovacinas metálicas superarem problemas decorrentes da vacinação tradicional com patógenos vivos atenuados ou patógenos inativados, a aplicação e a estabilidade das nanobiointerfaces em sistemas biológicos continuam sendo uma lacuna questionável que se relaciona com o método de conjugação. Este trabalho descreve a bioconjugação via atração eletrostática e ligação covalente de peptídeos imunogênicos na superfície de nanoesferas de ouro e avalia sua estabilidade em uma ampla gama de concentrações de sal e pH. O software Protean® foi usado para prever as sequências imunogênicas na proteína não estrutural 1 (NS1) dos 04 sorotipos do vírus da dengue (DENV), que foram sintetizado em fase sólida e caracterizado com HPLC e ICP-MS. Técnicas como UV-vis, Fluorimetria, FTIR, Raman, Potencial Zeta e DLS, bem como TEM foram empregadas para caracterizar ambas as abordagens eletrostática e covalente antes e depois da bioconjugação. A interação entre o peptídeo derivado de DENV1 NS1 com AuNP demonstrou melhor eficiência no processo de ligação e na estabilidade do nanbiomaterial conjugado para ambas as abordagens. Logo, esses dados abrem novas perspectivas para o uso de nanobioconjugados com peptídeos imunogênicos como plataformas para entrega de fármacos / imunógenos.

Palavras-chave: Nanopartículas de Ouro, Peptídeos sintéticos, Bioconjugação.

**BIOCONJUGATION OF GOLD NANOPARTICLES WITH SYNTHETIC PEPTIDES
BASED ON IMMUNOGENIC SEQUENCES IN NS1 DERIVED FROM DENGUE
VIRUS TYPES I, II, III AND IV**

ABSTRACT

COSTA, D.S. Bioconjugation of gold nanoparticles with synthetic peptides based on immunogenic sequences in NS1 derived from dengue virus types I, II, III and IV. 73f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Recently, nanocarriers made of synthetic peptides conjugated with gold nanoparticles (AuNP) has been considered an efficient platform for immunogen delivery and production of antibodies. Although metal nanovaccines surpass issues arising from traditional vaccination with live attenuated pathogens or inactivated pathogens, the application and stability of nanobiointerfaces in biological systems remains a questionable gap related to the method for conjugation. This work describes bioconjugation via electrostatic attraction and covalent bound of immunogenic peptides on the surface of gold nanosphere and evaluates their stability in a large range of salt concentrations and pH. Protean® software predicted the immunogenic sequences in non-structural protein 1 (NS1) from the 04 dengue virus (DENV) serotypes, then synthesized in solid phase and characterized with HPLC and ICP-MS. Techniques such as UV-vis, Fluorimetry, FTIR, Raman, Zeta Potential and DLS, as well as TEM were employed to characterize both electrostatic and covalent approaches before and after bioconjugation. The interaction between peptide derived from DENV1 NS1 with AuNP demonstrated better efficiency in the connection process and in the stability of the conjugated nanbiomaterial for both approaches. Therefore, these data open new perspectives for the use of nanobioconjugates with immunogenic peptides as platforms for drug / immunogen delivery.

Key words: Gold nanoparticles, Synthetic peptides, Bioconjugation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema contendo as principais partes de um nanocarreador baseado em peptídeos imobilizados em nanopartículas metálicas.	16
Figura 2: Cálice de Lycurgus. O vidro exibe cor verde quando a luz incide de fora para dentro, mas o cálice apresenta cor vermelha se iluminado de dentro para fora.	17
Figura 3: Diagrama dos níveis de energia de um sólido semiconductor cristalino semiconductor. (Adaptado de MARTINS; TRINDADE, 2012)	19
Figura 4: Esquema da movimentação de NS1 durante a replicação do DENV. Fonte: Adaptado de MULLER & YOUNG, 2013.	27
Figura 5: Sequência linear dos 352 aminoácidos que formam a proteína NS1 DENV, conforme o sorotipo do vírus dengue. Os intervalos destacados correspondem às porções imunogênicas preditas e posteriormente sintetizadas.	40
Figura 6: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 1.	41
Figura 7: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 2.	42
Figura 8: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 3.	43
Figura 9: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 4.	44
Figura 10: Informações geradas pelo BLAST para a sequência predita da NS1 oriunda do vírus dengue tipo 3.	46
Figura 11: Espectro obtido por espectrometria de massas do pNS1 DENV1 bruto. .	47
Figura 12: Espectro obtido por espectrometria de massas do pNS1 DENV2 bruto.	48
Figura 13: Espectroscopia de absorção no UV-visível da síntese de nanopartículas de ouro usando citrato de sódio como agente redutor.	49
Figura 14: Espectros de absorbância dos ensaios de interação eletrostática.	51
Figura 15: Reações químicas possíveis com EDC e NHS.	52
Figura 16: Espectros de absorbância dos ensaios de interação eletrostática.	54
Figura 17: Deslocamento hipsocrômico e efeito batocrômico das AuNPs após modificação.	56
Figura 18: Espectros da dosagem do sobrenadante das conjugações (à esquerda) com AuNP-MUA e (à direita) com AuNP-citrato.	56
Figura 19: Comparação da quantidade dos peptídeos dosados nos sobrenadantes de ambas estratégias de bioconjugação com os peptídeos.	57

Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs-MUA-DV3.	58
Figura 21: Potencial Zeta das AuNPs não conjugadas e bioconjugações com MUA ou via interações eletrostáticas.	59
Figura 22: À esquerda, resultados da análise DLS das AuNPS-citrato e subsequentes conjugações. À direita, os mesmos resultados para as AuNPs-MUA.	60
Figura 23: Interferograma dos ensaios aplicados às AuNPs-MUA e bioncojugados.	61
Figura 24: Espectro do espalhamento Raman para as AuNPs-MUA e formas bioconjugadas.	63
Figura 25: Ensaio de floculação das AuNPs-citrato em diferentes concentrações de sais.	64
Figura 26: Ensaio de floculação das AuNPs-MUA em diferentes concentrações sais.	65
Figura 27: Ensaio de floculação das AuNPs-citrato em diferentes faixas de pH.	65
Figura 28: Ensaio de floculação das AuNPs-MUA em diferentes faixas de pH.	66

LISTA DE SIGLAS

Au	Ouro (do latim <i>Aureos</i>)
AuNP	Nanopartícula de ouro (do inglês <i>Gold Nanoparticles</i>)
BLAST	Ferramenta de Alinhamento Básico Local (do inglês, <i>Basic Local Alignment Tool</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinamida
MUA	11-ácido mercaptoundecanóico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
MNPs	Nanopartículas metálicas (do inglês <i>Nanoparticles</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
NS1	Proteínas Não estrutural 1 (do inglês <i>Non structural 1</i>)
DENV	Vírus Dengue (do inglês <i>Dengue Virus</i>)
RPM	Rotações Por Minuto
°C	Grau Célsius
UV-vis	Espectroscopia (do inglês <i>Ultraviolet visible</i>)
DLS	Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>)
LSPR	Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
FTIR	Espectrometria Infravermelho com Transformada de Fourier
Raman	Espectrometria Raman

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Nanocarreadores metálicos	16
2.1.1 Nanopartículas de ouro	17
2.1.1.1 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL).....	18
2.1.2 Nanopartículas de ouro como carreadores de antígenos	21
2.2 Peptídeos como imunógenos	23
2.2.1 Imobilização de Peptídeos na superfície de Nanopartículas.....	24
2.3 Proteína não estrutural 1 do vírus dengue tipo 2	25
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAL e MÉTODOS	30
4.1 Reagentes.....	30
4.2 Síntese e caracterização de peptídeos	30
4.2.1 Prospecção de Banco de Dados.....	30
4.2.2 Alinhamento de Sequências	30
4.2.3 Síntese dos peptídeos de NS1 oriundas dos sorotipos I, II, III e IV do dengue	31
4.2.4 Caracterização dos peptídeos de NS1 oriundas dos sorotipos I, II, III e IV do dengue.....	31
4.2.5 Determinação da concentração dos peptídeos.....	32
4.2.6 Determinação teórica da quantidade de peptídeos que saturam as AuNP	32
4.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro	32
4.3.1 Nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio.....	32
4.3.2 Modificação da superfície das AuNP com MUA	32
4.3.3 Área superficial de nanopartículas de ouro	33
4.4 Bioconjugação dos peptídeos com AuNPs.....	34
4.4.1 Imobilização via atração eletrostática	34

4.4.2 Imobilização via ligação covalente.....	34
4.5 Caracterização dos coloides	35
4.5.1 Espectrometria UV-vis	35
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
4.5.3 Espectrometria vibracional no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	36
4.5.4 Espectrometria Raman	36
4.5.5 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	37
4.5.6 Potencial Zeta (PZ).....	37
4.5.7 Teste de floculação.....	37
4.5.8 Teste em diferentes faixas de pH.....	37
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	39
5.1 Síntese e Caracterização de Peptídeos	39
5.1.1 Prospeção de Banco de Dados.....	39
5.1.2 Alinhamento das sequências.....	45
5.1.3 Caracterização dos peptídeos.....	45
5.2 Síntese e caracterização de Nanopartículas de ouro	49
5.3 Bioconjugação dos peptídeos com AuNPs.....	50
5.3.1 Interação eletrostática	50
5.3.2 Acoplamento covalente	52
5.4 Caracterização	55
5.4.1 Espectrometria UV-vis	55
5.4.2 Microscopia eletrônica de Transmissão	57
5.4.3 DLS e Potencial Zeta.....	58
5.4.4 Espectrometria vibracional no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	60
5.4.5 Espectrometria Raman	62
5.4.6 Estabilidade	64
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A nanobiotecnologia tem o potencial de revolucionar o tratamento contra doenças virais através de imunizações mais seguras e eficazes. Recentemente, a integração dos avanços na engenharia de proteínas e nanotecnologia viabilizou o surgimento de plataformas para entrega direcionada de fármacos, ácidos nucleicos, proteínas e haptenos, incluindo os peptídeos sintéticos (PEER et al., 2007). As nanovacinas, definidas como nanocarreadores revestidos de substâncias imunogênicas, encontram numerosas barreiras na rota para seu alvo, sobretudo as variações do pH e da concentração de sais típicas de ambientes celulares, que podem induzir agregação e consequente toxicidade. Com isso, pesquisar nanocarreadores e desenvolvê-los a produtos aptos para o uso em sistemas fisiológicos requer a manipulação de estruturas, na escala nanométrica, que sejam biologicamente estáveis, como, por exemplo, o ouro.

Na medicina medieval e renascentista, o ouro coloidal (AuNPs) integrava o regime terapêutico de doenças cardíacas e venéreas, bem como disenteria, tumores e epilepsia, sendo usado também para o diagnóstico da sífilis (DANIEL; ASTRUC, 2004). Dentre os aspectos físicos e químicos marcantes para aplicações biotecnológicas e medicinais das AuNPs, destacam-se os fenômenos óptico-eletrônicos da ressonância plasmônica de superfície localizada (RPSL), e do espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS)(IMURA et al., 2006; LANGER; NOVIKOV; LIZ-MARZÁN, 2015). Outros atrativos igualmente relevantes contemplam sua baixa tendência à aglomeração e a grande área da superfície, a qual pode ser facilmente biofuncionalizada com um número vasto de biomoléculas. As modificações na superfície das AuNPs influenciam diretamente na sua carga líquida, responsável pela estabilidade do coloide. Tais efeitos associados ao tamanho e à superfície são especialmente notáveis para dimensões entre 1-100nm (DAS et al., 2011). Comparativamente, na escala nanométrica também existe uma organização complexa e sistemática de estruturas e de mecanismos imunobiológicos de proteção a longo prazo.

Atualmente, já se sabe que curtas sequências de aminoácidos, denominadas peptídeos, são nanoestruturas imprescindíveis para consolidar a memória imunológica, sendo este o propósito das vacinações. As vacinas tradicionais são preparadas a partir de vírus atenuados pelas múltiplas passagens em hospedeiros

não humanos; ou de vírus inativados frequentemente obtidos por meio de aquecimento ou uso de formaldeído para matar o patógeno (GUZMAN et al., 2016). Apesar desse modelo de vacinação ter melhorado a saúde humana e prevenir milhares de mortes ao redor do mundo, há questionamentos acerca da segurança desses bioprodutos devido ao potencial de infecção proveniente da reversão do patógeno a sua forma agressiva (virulenta); ou do potencial de não gerar imunidade ao conteúdo da vacina. Dessa maneira, a caracterização de um nanocarreador baseado somente em peptídeos imunogênicos acoplados na superfície de AuNPs é de grande interesse, visto que tais nanobiointerfaces têm potencial para sobrepor os mencionados empecilhos devido à versatilidade de suas propriedades.

Este trabalho visa à síntese e caracterização de uma nanobiointerface com perspectivas de que seja desenvolvida uma nanovacina. Para isso, peptídeos sintéticos oriundos da proteína não estrutural 1 (NS1) dos vírus Dengue sorotipo I, II, III e IV foram planejados por ferramentas de bioinformática, e sintetizados em fase sólida. Duas técnicas de acoplamento foram estudadas, como a atração eletrostática entre agentes biológicos e AuNPs, como também o uso dos reagentes EDC e NHS que são bem estabelecidos. A estabilidade das nanobiointerfaces foi testada através de espectroscopias tipo UV-vis, Raman, FTIR e fluorescências, bem como Potencial Zeta, DLS e MET e Eletroforese.

Com esta plataforma, espera-se suscitar o desenvolvimento de imunizantes mais confiáveis e menos invasivos, permitindo a imunização de uma quantidade maior de pessoas contra o dengue.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanocarreadores metálicos

Nanocarreadores imunoterapêuticos, doravante nanovacinas, são dispositivos que transportam e liberam substâncias imunoativas de modo eficiente em sistemas celulares específicos. Seus componentes incluem um imunógeno, capaz de desafiar seletivamente as habilidades protetoras do sistema imune; e o carreador que é usado como módulo de transporte, e de imunogenicidade para substâncias de baixo peso molecular (PEER et al., 2007; SKWARCZYNSKI, 2014; ZONG; COBB; CAMERON, 2017). Um esquema de nanovacina biofuncionalizada está retratado na Figura 1. Os diferentes tipos de nanovacinas podem ser classificados segundo a natureza química dos seus constituintes, sendo as nanobiointerfaces metálicas os mais promissores (GUPTA et al., 2013). Essas plataformas de entrega direcionada, algumas delas já disponíveis na prática clínica, diferem na constituição das matrizes de imobilização das biomoléculas, e nas diversas técnicas de conjugação e caracterização.

Cada uma das principais partes do nanocarreador proposto neste trabalho está descrita adiante.

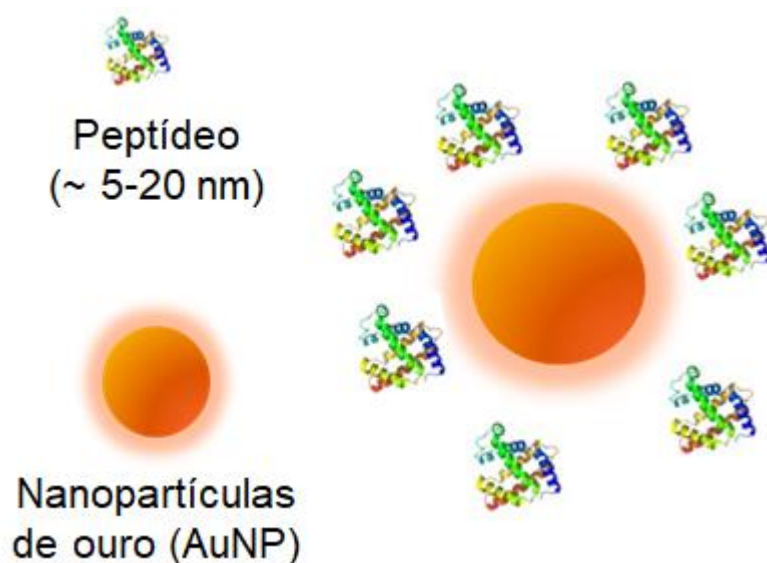


Figura 1: Esquema contendo as principais partes de um nanocarreador baseado em peptídeos imobilizados em nanopartículas metálicas.

2.1.1 Nanopartículas de ouro

O ouro é um metal inerte e resistente à oxidação que a humanidade utiliza desde o milênio 5º a.C., quando foi descoberto em Varna (Bulgária), enquanto o ouro coloidal foi descrito pela primeira vez entre os séculos 5º-4º a.C. na China e no Egito, onde era explorado para fins artísticos e medicinais. Um exemplo famoso e antigo do uso de ouro nanocristalino talvez seja o cálice de *Lycurgus*, exposto no *British Museum*, e retratado na Figura 2. Fabricado no século 4º d.C. em Roma, análises de sua matriz vítrea revelam coloides de ouro (AuNP) e de prata (AgNP) de aproximadamente 70 nm na proporção AuNP e AgNP de 1:14. Essa composição faz com o que o cálice seja vermelho à luz transmitida e verde à luz refletida (DANIEL; ASTRUC, 2004). A elucidação desses fenômenos ópticos associados ao coloide de ouro iniciou apenas no século XIX.



Figura 2: Cálice de Lycurgus. O vidro exibe cor verde quando a luz incide de fora para dentro, mas o cálice apresenta cor vermelha se iluminado de dentro para fora.

Em 1857, a relação entre o tamanho das AuNP com a coloração do coloide foi sugerida no trabalho seminal de Michael Faraday, que sintetizou AuNP usando o fósforo branco como agente redutor e o dissulfeto de carbono como estabilizante (FARADAY, 1857). A partir desse relato, grandes esforços têm sido dedicados à síntese, estabilização e funcionalização de AuNP com tamanho e formato controlados, haja visto a diversidade de condições experimentais registradas em publicações e patentes. (AH et al., 2006; VIGDERMAN; ZUBAREV, 2012; ZHONG; NJOKI; LUO, 2009)

Um dos marcos da síntese química de AuNP é atribuído a TURKEVICH; GARTON; STEVENSON, 1954, que sintetizaram AuNPs em meio aquoso utilizando citrato de sódio como agente redutor do ácido tetracloráurico (HAuCl_4). Dada a simplicidade e reprodutibilidade desse protocolo, (BRUST et al., 2000) demonstrou que era possível controlar o tamanho das AuNP (16 nm a 147 nm) variando somente a concentração do citrato de sódio. Posteriormente, o grupo do professor Schmid cunhou a noção dos chamados “pontos quânticos” ao produzir *clusters* de ouro (< 1 nm) usando fosfino. Já Mulvaney e Giersing, em 1993, relataram a primeira síntese e estabilização de AuNP tioladas, as quais foram preparadas com alcanotióis de vários comprimentos de cadeia. Na linha dos tiolados, o método Brust-Schiffrin (BRUST et al., 2000) é considerado o maior êxito de síntese *in situ* ouro coloidal tiolado. Essa técnica pioneira facilitou a síntese de AuNP estáveis ao ar e a altas temperaturas, com tamanho controlado e dispersividade estreita. Além disso, as AuNPs podem ser repetidamente isoladas e ressuspensas sem evidências de agregação ou decomposição, sendo também passíveis de manipulação e funcionalização via substituição de ligante. Recentemente, um estudo detalhado conduzido por (KUMAR; GANDHI; KUMAR, 2007) comprovou que os tióis deslocam as moléculas de dicarboxi acetona, responsáveis pela estabilização das AuNP, para formar a ligação covalente Au-S.

Uma consequência da redução do tamanho médio das partículas de um material é o aumento da área superficial por volume. Por exemplo, numa nanopartícula de 20 nm cerca de 12% dos átomos estão na superfície, enquanto numa NP com 10 nm de diâmetro 25 % dos átomos são superficiais, e em 5nm ~50% dos átomos da NP se encontram na superfície (CAO, 2004). Em outros termos, o percentual de átomos superficiais em relação à quantidade total de átomos da NP aumenta conforme o tamanho da NP diminui. Essa elevada razão área de superfície por volume determina certas propriedades tanto ópticas quanto carreadoras dos nanomateriais (WILEY et al., 2006).

2.1.1.1 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL)

O interesse global nas AuNP é principalmente devido à Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (do inglês, LSPR – “*Localized Surface Plasmon Resonance*”), que é o resultado exclusivo da interação entre a luz com as nanopartículas metálicas. Esse fenômeno óptico é gerado quando os elétrons da banda de condução oscilam

local e coletivamente na superfície das nanopartículas, em resposta ao campo magnético da luz incidente (WILEY et al., 2006).

Segundo o modelo atômico Bohr, cada átomo possui níveis de energia bem definidos. Quando os átomos se agrupam para formar uma estrutura cristalina, seus níveis energéticos mais altos, isto é, os mais distantes do núcleo, tornam-se contínuos, gerando as denominadas bandas de energia. Essa proximidade entre os átomos e seus respectivos níveis energéticos é uma característica marcante dos sólidos na escala nanométrica. Os elétrons dos níveis mais energéticos (camada d do ouro), que antes pertenciam aos átomos individuais, agora ocupam preferencialmente as bandas de energia recém-formadas: de valência e/ou de condução Figura 3. Geralmente, a banda de valência comporta a maior parte desses elétrons, enquanto a banda de condução abriga poucos ou nenhum deles. A diferença de energia interbandas é chamada de hiato óptico (MARTINS; TRINDADE, 2012). Para que um elétron da banda de valência consiga ocupar a banda de condução, ele deve absorver um fóton com energia maior do que esse hiato energético. Uma vez na banda de condução, os elétrons conseguem se propagar livremente sobre a extensão metálica da nanopartícula, promovendo os efeitos ópticos únicos e sensíveis à irradiação eletromagnética (WALKER; HALLIDAY; RESNICK, 2009; (FAN; ZHENG; SINGH, 2014; MESSERSMITH; NUSZ; REED, 2013).

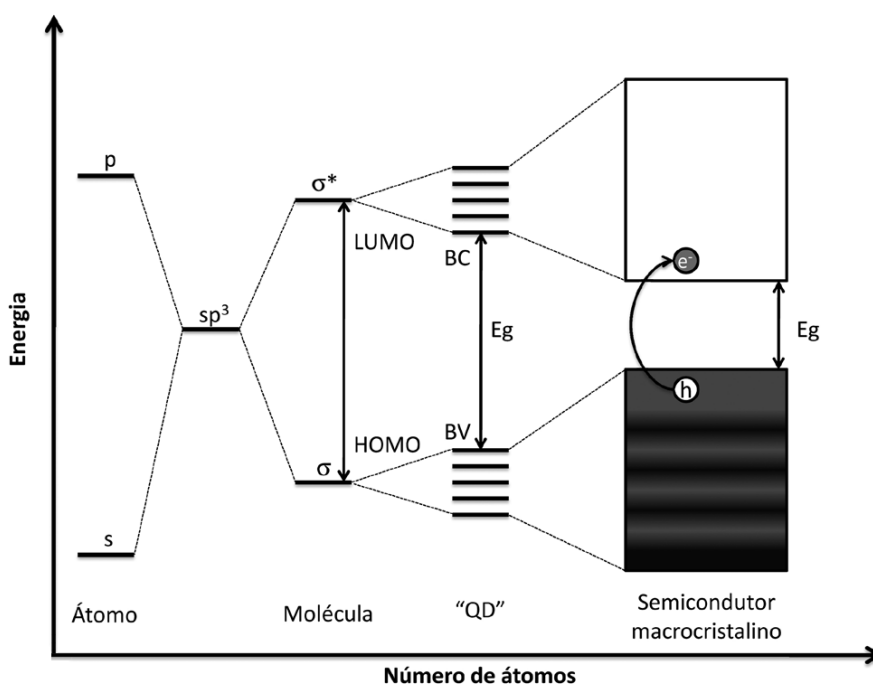


Figura 3: Diagrama dos níveis de energia de um sólido semiconductor cristalino semiconductor. (Adaptado de MARTINS; TRINDADE, 2012)

Matematicamente, se $r/\lambda < 0,1$ (sendo “r” o raio da nanopartícula e λ o comprimento de onda da luz incidente), a oscilação dos elétrons livres será ressonante ao campo magnético da onda eletromagnética incidente. Nessa condição, forças restauradoras também interferem no movimento da densidade eletrônica, intensificando a separação de cargas na superfície da MNP, que culmina no dipolo oscilante típico da LSPR (ZHAO; LI; ASTRUC, 2013). Esse fenômeno somente ocorre em nanopartículas maiores que 2 nm, pois, abaixo desta faixa, as mencionadas bandas energéticas se afastam a uma distância (hiato óptico) maior do que a mínima necessária para manter o LSPR (GRIESHABER et al., 2008; HUANG; EL-SAYED, 2010). Isso limita o movimento dos elétrons ao confinamento quântico do *cluster* ($MNP < 2nm$), de modo que eles realizam apenas transições eletrônicas entre os orbitais das camadas mais energéticas, gerando fluorescência. No geral, a mobilidade dos elétrons em nanoestruturas depende dos contornos e da composição das nanopartículas, da carga superficial e estrutura cristalina, bem da distância entre as partículas (HUANG; EL-SAYED, 2010). Além disso, a dielétrica do meio, bem como o índice de refração do solvente influenciam os deslocamentos ópticos, conforme postulado por Mie (PAPOFF; HOURAHINE, 2011).

A teoria de Mie racionalizou o modelo de interação entre as nanopartículas com a luz usando equações do eletromagnetismo clássico de Maxwell. Enquanto muitos cientistas ponderam o termo absorção de luz, Mie considera essa unidade como extinção. Depois de atravessar uma suspensão coloidal, a quantidade de luz que atinge o detector do espectrofotômetro é um remanescente da radiação absorvida e da radiação espalhada pelas AuNP, sendo a extinção a soma da absorbância e do espalhamento. Como a extinção se relaciona com a seção transversal das AuNP *quasi*-esféricas, logo ela pode ser predita em função do tamanho da AuNP (HAISS et al., 2007).

Deslocando-se a absorção e o espalhamento, a cor de filmes e coloides de nanopartículas também pode ser ajustada: por exemplo, soluções de AuNPs esféricas têm cor vermelho-rubi, devido à forte absorção e ao espalhamento na região verde do espectro, enquanto soluções de AgNPs são amarelas porque há ressonância plasmônica na região azul do espectro. Por meio de análise espectrofotométrica, constata-se que as AuNP absorvem a radiação eletromagnética nos comprimentos de

onda (λ) entre 500-600 nm. Diferentes picos de λ são observados à medida que as dimensões das nanopartículas variam (FUERTES et al., 2016).

Atualmente, nanomateriais de ouro e de outros metais, como prata, cobre e dióxido de titânio já são incorporados em plásticos, tintas e outros produtos comercializados (LANGER; NOVIKOV; LIZ-MARZÁN, 2015). Em particular, as AuNP são provavelmente as nanoestruturas com maior destaque entre os colóides metálicos devido à biocompatibilidade e à facilidade de serem biofuncionalizadas com ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos (ZHANG, 2010). Tais aspectos suscitam o interesse das áreas farmacêutica e biotecnológica, que dedicam esforços para construir novas nanobiointerfaces capazes de revolucionar, por exemplo, a entrega de fármacos e de imunógenos. Inclusive, as AuNP são adequadas ao uso em sistemas biológicos por serem nanomateriais não tóxicos, inertes e de fácil conjugação com biomoléculas ou ligantes sintéticos

2.1.2 Nanopartículas de ouro como carreadores de antígenos

Dentre os colóides metálicos, as AuNPs apresentam maior estabilidade e fácil reatividade com biomoléculas. Isso atrai um interesse significativo da nanobiotecnologia terapêutica alinhada à pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&D&I) de plataformas para entrega direcionada de fármacos ou de outros compostos de interesse biológico. De fato, as AuNPs têm sido administradas, de modo recorrente, tanto em animais quanto em seres humanos por via parenteral (GLAZER et al., 2011).

Uma vez introduzidas na corrente sanguínea de mamíferos, o organismo submete o coloide de ouro aos mecanismos fisiológicos de autoproteção que visam (1) removê-los e/ou (2) neutralizá-los. Para a eliminação das AuNP, é suficiente que elas sejam capturadas pelas células hepáticas, excretadas através da bile, e eliminadas do corpo juntamente com as fezes (DE JONG et al., 2008). A influência dos contornos e da composição sobre a compatibilidade biológica das AuNPs já é bem conhecida (LI et al., 2016), em contraste com o que se sabe atualmente sobre os efeitos no sistema imune.

Muitas pesquisas corroboram os efeitos imunoestimulantes das AuNPs, dos quais podemos citar o aumento do tamanho corpuscular dos macrófagos acompanhado de elevação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-alfa, bem como de IL-2 (YEN; HSU; TSAI, 2009). Além disso, há também estimulação de células assassinas naturais (NK) com AuNP de 12 nm e proliferação de linfócitos (LE GUÉVEL et al., 2015). As AuNPs de 2 nm (SHUKLA et al., 2005), 3 nm (LIM et al., 2008; ZHANG et al., 2011) e 60 nm (JONES, 2015) conseguem penetrar macrófagos via pinocitose, permanecendo no interior dos lisossomos e no espaço perinuclear. Para tais autores, as AuNP possuem biocompatibilidade, pouca toxicidade e nenhuma imunogenicidade aparente .

A biossíntese de anticorpos é induzida somente por moléculas com peso > 5 KDa (imunogenicidade). Exemplos de imunógenos incluem proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ligantes sintéticos. Contudo, muitas substâncias bioativas (vitaminas, hormônios, fármacos, tóxicos e outros) detêm uma massa molecular relativamente baixa, sendo incapazes de eliciar a produção de anticorpos . Essa limitação é superada por meio de acoplamento químico dos haptenos com carreadores de maior peso molecular . Normalmente, a hemocianina do molusco marinho *Megathura crenulata* (KLH) é o mais usado como carreador por ser uma glicoproteína maciça (400-800 KDa) que elicia uma intensa resposta imune de células T (THOBHANI et al., 2010). Por meio de reações que formam ligações amida, a superfície do KLH torna-se revestida de várias cópias do hapteno. Dessa maneira, a apresentação dos haptenos no carreador também estimula os receptores imunológicos de células B, culminando na produção de anticorpos anti-haptenos. Em geral, o soro obtido a partir do bioconjugado proteína-hapteno reconhece partes específicas tanto do carreador proteico quanto do hapteno. A base teórica dessa incapacidade dos haptenos produzirem anticorpos por eles mesmos é bem compreendida por Jules Bordet (THOBHANI et al., 2010).

Segundo a teoria físico-química da imunidade proposta por J. Bordet, a imunogenicidade de um antígeno depende das suas propriedades físico-químicas, sobretudo no seu estado coloidal. A partir dessa premissa, estudos demonstraram que injeções de antígenos misturadas com coloides metálicos estimulam a produção de anticorpos. Até mesmo haptenos adsorvidos na superfície das MNPs induziram a produção de imunoglobulinas. (NEEFJES; OVAA, 2013) descreveu numerosas

influências das AuNP sobre reações imunes inespecíficas. Nota-se um aumento considerável da quantidade total de leucócitos por mililitro de sangue (de 9.900 para 19.800), incluindo de polimorfonucleares (de 4.700 para 14.900) cerca de 2h após administração endovenosa de 5 mL de AuNP em coelhos. As injeções de outros colóides metálicos não causaram, até então, reações equivalentes. Essa capacidade imunoestimulante do ouro coloidal é cientificamente interessante por (1) produzir anticorpos contra imunógenos de baixo peso molecular (haptenos), e (2) introduzir uma nova geração de vacinas baseada em peptídeos sintéticos ou naturais.

2.2 Peptídeos como imunógenos

Os peptídeos são considerados subprodutos intermediários da degradação de proteínas oriundas do próprio organismo (endógenas) ou de agentes externos (exógenas). Biologicamente, eles podem ser responsáveis por, dentre outras funções, 1) fornecer aminoácidos para a construção endógena de novas proteínas; e por 2) direcionar processos imunobiológicos envolvidos na marcação de células infectadas ou tumorais, e na produção de anticorpos. Quando uma proteína estranha penetra o organismo, diversas enzimas proteolíticas e proteossomas intracelulares a digerem em fragmentos de 3-18 aminoácidos. Uma vez formados no interior das células, menos de 1 % desses peptídeos sobrevive à destruição catalisada pelas aminopeptidases citosólicas (CASCIO, 2001). Parte dessa fração remanescente corresponde à única porção da estrutura nativa do antígeno com a qual os anticorpos interagem para neutralizar a infecção. A menor porção de aminoácidos de um antígeno que é reconhecida pelos anticorpos denomina-se epítipo.

Somente as sequências com mais de 8 aminoácidos são consideradas epítipos, pois neste comprimento elas atravessam a membrana do retículo endoplasmático (RE), via transportadores associados com processamento de antígenos (TAP, do inglês *"transporters associated with antigen-processing"*), para acessar o sítio de interação do Complexo de Histocompatibilidade (MHC). Este, também referido como Antígeno Leucocitário Humano (HLA), é uma glicoproteína transmembrana do RE que se subdividem, por motivos de polimorfismo genético, nas classes I e II, desempenhando funções imprescindíveis para o êxito da resposta imune adaptativa (GROMMÉ et al., 1997).

O MHC de classe I está presente em todas as células, enquanto o de classe II está presente apenas nas células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B). Ambas as classes de MHC se constituem de cadeias pesada (H) e leve (L) capazes de estabilizar peptídeos (~ 9 aminoácidos) através de interações não covalentes, as quais estão sujeitas ao alinhamento minucioso entre as moléculas. A partir dessa interação, o complexo peptídeo-MHC é endereçado para a superfície celular. Nesta etapa, as células de defesa do tipo T (CD8⁺) reconhecem o complexo MHC-peptídeo e libera os mediadores químicos que condicionam apoptose (MHC classe I) (TAM, 1988).

Muitos peptídeos exibem características antigênicas, porém nem todos são igualmente eficazes para eliciar anticorpos que os reconheçam na proteína nativa correspondente. Basicamente, o tamanho e a localização tridimensional deles, bem como seu grau de homologia com sequências de outras proteínas determinam sua aplicação (AIYEGBO et al., 2014). No campo da biologia sintética, ferramentas de bioinformática vêm sendo implementadas e utilizadas para mapear as sequências antigênicas mais exclusivas e posicionadas na superfície externa da proteína. Essa estratégia é fundamental para limitar reações inespecíficas dos anticorpos gerados com outros tipos de antígenos proteicos (TAM, 1988).

A capacidade de os peptídeos induzirem a produção de anticorpos é cuidadosamente planejada através de técnicas *in silico* robustas e confiáveis, que antecedem a síntese. Uma vez sintetizados, essa imunogenicidade somente é lograda após conjugação com carreadores de maior peso molecular (> 11 KDa) como KLH, nanopartículas, micelas, MAPs e outros (TIMKOVICH, 1977).

2.2.1 Imobilização de Peptídeos na superfície de Nanopartículas

A conjugação de peptídeos com nanopartículas de ouro gera uma nanobiointerface cuja massa total é suficiente para disparar uma resposta imune com produção de anticorpos antipeptídeos. Um aspecto que interfere diretamente nessa capacidade imunogênica recém-adquirida pelos peptídeos é o tipo de imobilização empregado para as fases biológica e inorgânica. Geralmente, as principais técnicas utilizadas se baseiam na 1) adsorção via atração eletrostática, interações hidrofóbicas e de van der

Waals; ou no 2) acoplamento covalente, explorando a tendência de ligação entre os grupamentos funcionais de ambas as fases (MU et al., 2014).

Uma das estratégias mais simples de conjugação se vale da atração iônica que acontece quando o pH do meio está próximo do ponto isoelétrico (pI) do peptídeo. Nesta condição, que é pouco reprodutível, a biomolécula adsorve na superfície da matriz de imobilização sem orientação padronizada. Em contraste, os métodos de acoplamento covalente representam uma alternativa à essa falta de controle sobre os planos de interação entre as biomoléculas e a superfície da matriz.

Um dos protocolos mais comuns para imobilizar biomoléculas utiliza os agentes EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-Hidroxisuccinamida). O EDC é um agente de ligação cruzada de comprimento zero que acopla radicais carboxílicos a aminas primárias. Apesar desse processo ocorrer exclusivamente com o uso do EDC, a adição do NHS ou Sulfo-NHS alavanca a eficiência da ligação, de modo que as amostras contendo grupos ativados por estes reagentes podem ser armazenadas para uso posterior. Além disso, o EDC e o NHS não participam da ligação entre a biomolécula e a AuNP, ao contrário de outros reagentes como o glutaraldeído, por exemplo. Outro aspecto igualmente relevante é que esta reação pode ocorrer à temperatura ambiente (BRANDT et al., 1970).

2.3 Proteína não estrutural 1 do vírus dengue tipo 2

Inicialmente, a DENV NS1 foi descrita como um antígeno solúvel de fixação de complemento oriundo do vírus dengue (SMITH; WRIGHT, 1985). Todavia, ensaios subsequentes evidenciaram que o antígeno era uma glicoproteína (RICE et al., 1985) análoga à NS1 do vírus da febre amarela (MULLER; YOUNG, 2013; YOUNG et al., 2000), cabendo a revisão para a nomenclatura vigente. Na atualidade, três formas estruturalmente distintas da DENV NS1 são reconhecidas: monomérica (recém sintetizada), dimérica (mNS1 – Figura 4 –, associada à membrana plasmática ou vesículas) e hexamérica (sNS1 –, secretada no sangue como lipoproteína) (CRABTREE; KINNEY; MILLER, 2005; WINKLER et al., 1988). Composta por 352 aminoácidos que integram 12 resíduos de cisteína e 02 sítios de N-glicosilação relativamente conservados entre os flavivírus, seu peso molecular varia de 46-55 KDa dependendo do estado da glicosilação (GUTSCHE et al., 2011; MULLER; YOUNG,

2013). Os hexâmeros conectados a lipídeos (colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios) pesam cerca de 310 KDa (LIN et al., 2012), e alcançam 645 KDa devido à agregação com pelo menos 5 tipos diferentes de proteínas do hospedeiro (ALCON-LEPODER et al., 2006; PEELING et al., 2010). Durante a infecção primária ou secundária pelo DENV, a concentração sérica de sNS1 é detectável até 9 dias após o início dos sintomas (SCATURRO et al., 2015).

Durante a produção e maturação da DENV NS1, a N-glicosilação consiste em adicionar uma manose hidratada à amida da cadeia lateral dos aminoácidos asparagina localizados nas posições 130 e 207 da NS1 monomérica (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Essa reação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER) mediante ação catalítica da enzima glicosidase (WALLIS et al., 2004). Por conseguinte, ligações dissulfeto entre os 06 pares de cisteína (C1/C2, C3/C4, C5/C6, C7/C12, C8/C10 e C9/C11) (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016) parecem dimerizar a glicoproteína (JACOBS et al., 2000) e interagir com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI-NS1) na membrana do RE (AKEY et al., 2014; YOUNG et al., 2000), conforme Figura 4. Embora monômeros sejam hidrofílicos, sua forma dimérica tem natureza hidrofóbica, razão pela qual se associam à membrana do RE, com ou sem intermédio de jangadas lipídicas.

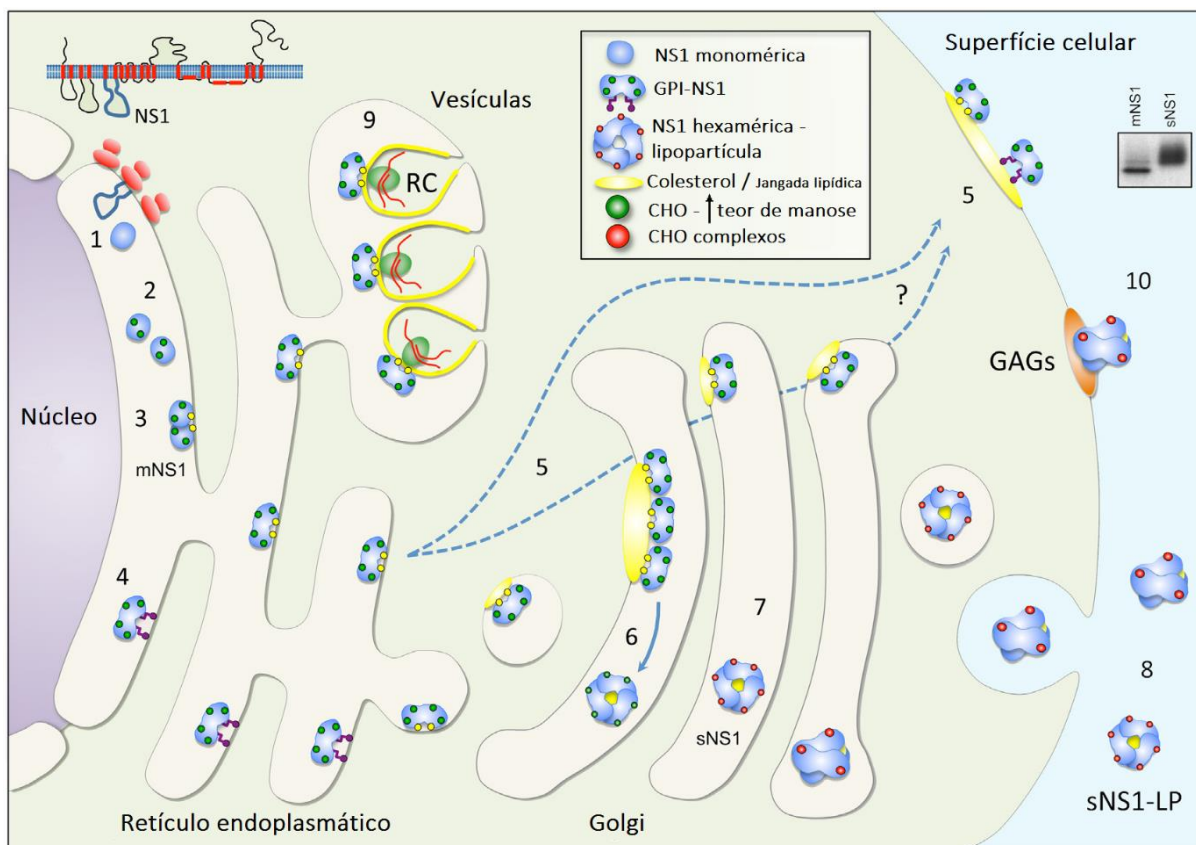


Figura 4: Esquema da movimentação de NS1 durante a replicação do DENV. (1) A NS1 é separada da glicoproteína E mediante clivagem por uma peptidase sinal, formando a subunidade monomérica hidrofílica. (2) Este monômero é N-glicosilado com carboidratos ricos em manose que alteram sua conformação e hidropaticidade. (3) Consequentemente, dímeros são formados (mNS1) e sua hidrofobia recente induz associação à membrana do RE. (4) Todavia, interações com a membrana também ocorrem quando parte dos dímeros se liga a âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI-NS1). (5) Ambas mNS1 e GPI-NS1 trafegam por rotas bioquímicas ainda desconhecidas para atingir a superfície celular, onde permanecem associadas a jangadas lipídicas imobilizadas na membrana plasmática. (6) No Golgi, unidades diméricas se organizam para formar hexâmeros solúveis. (7) Tais hexâmeros adquirem uma carga lipídica que é confinada em sua estrutura central. Então, a manose dessa lipoproteína hexamérica solúvel (sNS1) é processada a uma forma de carboidrato complexo (CHO vermelho). (8) Então, a sNS1 é secreta para o meio extracelular. (9) A diferença da composição dos carboidratos (CHO) entre as formas de NS1 está evidenciada nas bandas do SDS-PAGE. Essa disparidade contribui para que parte das mNS1 se concentrem em vesículas, nas quais permanecem juntamente com outras proteínas não estruturais para compor o complexo replicativo. (10) Uma porção das NS1 expostas na superfície celular pode advir de formas previamente secretadas (sNS1) que se ligaram à glicosaminoglicanos superficiais (GAGs). Fonte: Adaptado de MULLER & YOUNG, 2013.

Após a dimerização, a NS1 é imediatamente endereçada para um de três sítios diferentes: complexo de replicação, membrana plasmática ou meio extracelular (MULLER; YOUNG, 2013). Apesar de suas funções no complexo replicativo não sejam elucidadas (AVIRUTNAN et al., 2011), ambas mNS1 e sNS1 promovem concomitantemente evasão e estímulo da resposta imune, pois inibem proteínas do sistema complemento (AVIRUTNAN et al., 2011), enquanto induzem a produção

elevada de anticorpos IgG anti-NS1 (FALCONAR, 1997). Esses anticorpos anti-NS1 reagem de modo inespecífico com fatores de coagulação sanguínea, fibronectina, integrinas (LIN et al., 2012) e outros componentes imprescindíveis à manutenção do sistema vascular, sugerindo envolvimento no vazamento de plaquetas em quadros severos da doença.

No leito vascular, a sNS1 pesa cerca de 310 KDa também forma oligômeros de até 645 KDa devido à agregação de pelo menos 5 tipos diferentes de proteínas do hospedeiro ao antígeno (MULLER; YOUNG, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de bioconjugação usando nanopartículas de ouro como plataforma de entrega de peptídeos imunogênicos

3.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar a predição *in silico* de sequências imunogênicas presentes nos antígenos NS1 dos quatro sorotipos da dengue;
- II. Sintetizar e caracterizar as sequências imunogênicas obtidas por predição *in silico*;
- III. Sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro monodispersas utilizando citrato de sódio como agente de redução;
- IV. Comparar a eficiência de bioconjugação por atração eletrostática e acoplamento covalente dos peptídeos sintéticos com as nanopartículas de ouro;
- V. Avaliar a estabilidade dos nanobioconjugados obtidos em diferentes condições de pH e força iônica.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Reagentes

Foram utilizados o Ácido Tetracloroáurico e o Citrato Trissódico para a síntese de AuNP. Para a funcionalização das AuNP-citrato, utilizou-se 11-Ácido mercaptoundecanóico (447528). O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), e o N-hidroxisuccinamida (NHS), foram usados para o acoplamento covalente dos peptídeos. Para construir a curva padrão, usou-se a albumina sérica bovina (BSA) liofilizada (05470). Esses reagentes tinham pureza analítica e foram adquiridos da Sigma Aldrich. Já as vidrarias foram lavadas com água corrente e detergente, e higienizadas com água régia (HCl 3:1 HNO₃) preparada a fresco, seguida de nova lavagem com água destilada, e finalmente ambientalizadas com água ultrapura e secadas em estufa a 37°C.

4.2 Síntese e caracterização de peptídeos

4.2.1 Prospeção de Banco de Dados

A sequência linear de aminoácidos da proteína *non-structure 1* (NS1) oriunda dos sorotipos I, II, III e IV do dengue foi obtida através de buscas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para identificar os fragmentos potencialmente imunogênicos e suas respectivas localizações na sequência linear da NS1, análises *in silico* de cada isoforma foram realizadas através do software Protean 3D®. Neste estudo foram usados apenas os fragmentos com maior número de aminoácidos localizados na superfície externa da proteína.

4.2.2 Alinhamento de Sequências

A fim de impedir que as sequências estabelecidas pelo Protean 3D® tenham alto grau de homologia com outras proteínas, o programa *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) foi utilizado. Por meio desta, foram informadas o grau de similaridade entre as

sequências eleitas com a sequência de outras proteínas armazenadas em seu banco de dados. Os dados relativos ao “Score” revelam o grau de similaridade, isto é, quanto menor o valor do “Score”, pior será o grau de similaridade e, por conseguinte, maior será a exclusividade dos fragmentos obtidos. O grau “E” (Expected) de significância dos resultados também deve ser baixo, pois significa uma baixa probabilidade de que os alinhamentos requeridos tenham ocorrido ao acaso.

A confirmação de que as sequências preditas são exclusivas de suas respectivas isoformas de NS1 DENV foi lograda por meio dos alinhamentos global e local fornecidos pelo BLAST. Assim, um pareamento de cada sequência predita com a ordem dos aminoácidos de outras proteínas depositadas no banco de dados NCBI gerou valores de pontuação (Score) que indicaram o percentual das posições similares entre as cadeias. Já o valor de “E” (Expected) compreende o grau de significância do resultado da pesquisa, sendo que valores baixos indicam uma baixa probabilidade de o alinhamento ter ocorrido de modo aleatório.

4.2.3 Síntese dos peptídeos de NS1 oriundas dos sorotipos I, II, III e IV do dengue

A síntese dos peptídeos correspondentes às sequências previamente selecionadas por abordagens *in silico* foi realizada por meio de uma colaboração da Professora Doutora Maria Aparecida Juliano, do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina (EPM), na Universidade Federal de São Paulo, cujo grupo de pesquisa tem experiência comprovada na síntese em fase sólida de pequenos peptídeos.

4.2.4 Caracterização dos peptídeos de NS1 oriundas dos sorotipos I, II, III e IV do dengue

O ponto isoelétrico (pI) de cada peptídeo foi estimado com base em análises *in silico* realizadas no programa *Protein Physical and Chemical Parameters* do ExPASy® (disponível em: <http://web.expasy.org/protparam/>). A pureza dos peptídeos sintéticos foi avaliada por técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em colaboração com a professora doutora Suely Gomes de Figueiredo.

4.2.5 Determinação da concentração dos peptídeos

Para determinar a concentração de cada peptídeo sintético fornecido, 1 mL de água ultrapura foi adicionado nos respectivos frascos contendo o liofilizado, gerando soluções de estoque. Realizou-se a diluição seriada com as soluções estoque e água ultrapura nas proporções de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000, as quais foram dosadas por espectrofluorimetria (excitação em 229 nm e emissão em 350-500 nm).

4.2.6 Determinação teórica da quantidade de peptídeos que saturam as AuNP

A quantidade de peptídeos necessária para cobrir a área de superfície total das AuNP-citrato e das AuNP-MUA foi calculada através de fórmulas matemáticas. Dado o comprimento médio dos peptídeos igual a 2 nm, calculou-se a quantidade mínima deles para revestir a área superficial total de cada coloide, previamente determinada. Resumidamente, o número de moléculas peptídicas para cobrir a extensão da área supracitada foi determinado a partir do valor previamente encontrado da área superficial total. Em seguida, a massa de uma molécula de peptídeo foi calculada dividindo sua massa molecular pelo número de Avogrado. Por fim, multiplicou-se esta massa obtida com a quantidade de moléculas peptídicas estimadas.

4.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro

4.3.1 Nanopartículas de ouro sintetizadas com citrato de sódio

A síntese de AuNP foi realizada segundo a otimização publicada pelo nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2017). Resumidamente, 10 mL de HAuCl_4 $2,5 \cdot 10^{-4}$ M foram aquecidos à 100°C sob agitação magnética no condensador, com adição subsequente de 1 mL de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 1 %. A mistura reagiu a 400 rpm por 15 minutos e o coloide foi resfriado em banho de gelo, sendo acondicionado em tubos estéreis de sedimentação e armazenados em geladeira (2-8°C) para uso posterior.

4.3.2 Modificação da superfície das AuNP com MUA

O ácido mercaptoundecanoico (MUA) possui 11 átomos de carbono entre os grupos funcionais COOH e SH . Imediatamente, adicionou-se 1 mL de uma solução etanólica

de 10 mM de MUA em 10 mL de ouro coloidal sob agitação de 800 rpm por 100h à temperatura ambiente (25°C). Após esse intervalo, o coloide com MUA foi filtrado (.22 µm) com seringa estéril para remoção de subprodutos particulados, sendo também acondicionado em tubo estéril de sedimentação e armazenado em geladeira (2-8°C) para uso posterior.

Para os ensaios de conjugação covalente das nanopartículas de ouro com o peptídeo, é necessária a modificação química da superfície do metal. O 11-ácido mercaptocarboxílico (MUA) é um ligante tiolado amplamente utilizado para ensaios de conjugação com biomoléculas (ZHANG et al., 2000). Isto é devido ao fato de este ligante possuir em uma das extremidades o S (enxofre) que se ligará por meio de ligação covalente dativa com os átomos de ouro da superfície metálica, e um grupamento COOH (ácido carboxílico) na sua extremidade terminal que facilitará a interação com as aminas primárias da cadeia dos peptídeos. Além disso, estes já estabelecem uma forte interação com superfícies de ouro através da amina primária da extremidade N-terminal (THOBHANI et al., 2010).

Após a etapa de funcionalização, análises com as espectrometrias UV-vis, FTIR e espalhamento Raman foram realizadas a fim de confirmar a formação das monocamadas automontadas (do inglês, “SAMS – Self Assembled Monolayers”) provocadas pela adsorção dos ligantes na superfície metálica.

4.3.3 Área superficial de nanopartículas de ouro

Assumindo o padrão de AuNP *quasi*-esféricas de 18 nm na concentração de 27 mg / mL, o volume, a massa e a área superficial de uma única partícula foram calculados. Inicialmente, calculou-se o volume através da fórmula $V = 4/3 \pi r^3$, onde V é o volume, π é constante de circunferência (3,14) e r o raio (9 nm) da AuNP-cit. Já a massa de uma AuNP foi calculada aplicando o resultado V na fórmula $d = m / V$, onde d é a densidade do ouro (19.300 Kg/m³), m é a massa da AuNP e V é o volume dela. Para calcular a quantidade de AuNP-cit em 1 mL de coloide, bastou-se dividir os 27 mg pela massa obtida. Em seguida, a área foi calculada através da fórmula $A = 4 \pi r^2$, e o valor de A foi multiplicado pela concentração de AuNP-cit para estimar a área de superfície total do coloide.

4.4 Bioconjugação dos peptídeos com AuNPs

Os ensaios de bioconjugação para os peptídeos derivados da NS1 dos sorotipos I, II, III e IV do vírus Dengue foram realizados de duas maneiras. A primeira, comumente empregada para formação de nanobioconjugados (BEHZADI et al., 2015), explora a tendência natural de interação por atração eletrostática. A segunda, utiliza a estratégia de acoplamento por ligação covalente através dos compostos EDC e NHS. Para confirmar e caracterizar a imobilização desses peptídeos em ambas as abordagens, leituras espectrométricas no UV-vis, IR e Raman foram realizadas, bem como a obtenção de imagens de MET.

4.4.1 Imobilização via atração eletrostática

Para conjugar eletrostaticamente uma cadeia peptídica à superfície de uma AuNP é necessário que o pH da solução esteja 0.5 acima do pI do peptídeo. O ponto isoelétrico (pI) de cada peptídeo foi estimado com base em análises *in silico* (ExPASy® ProtParam). Assim, triplicatas de quatro alíquotas de 1 mL de AuNP-cit foram centrifugadas (16.873 g, 20 min), seu sobrenadante (975 μ L) foi descartado e o pellet (25 μ L) foi ressuscitado em soluções (1 mL) alcalinas de NaOH com pH ajustado (peptídeo Dengue 1 = 10.82; peptídeo Dengue 2 = 11.30; peptídeo Dengue 3 = 10.02; peptídeo Dengue 4 = 10.94) em 0.5 (+/- 0.1) maior que o pI de cada peptídeo. Alíquotas de 2.5 μ g / mL de cada peptídeo foram adicionados às respectivas suspensões sob baixa agitação (100 rpm) durante 30 minutos à temperatura ambiente (25°).

Após esse intervalo, analisou-se o perfil óptico do nanobioconjugado por espectroscopia UV-vis usando cubeta de quartzo. Depois, a solução foi centrifugada (16.873 g, 20 min) e o sobrenadante (975 μ L) analisado por UV-vis a fim de quantificar a massa de peptídeos que não se ligou à AuNP e indiretamente estimar o quantitativo adsorvido na superfície da AuNP.

4.4.2 Imobilização via ligação covalente

O grupo carboxílico (COOH) das moléculas de MUA ligadas à AuNP foram ativados segundo o protocolo EDC/NHS. Simultaneamente, alíquotas de 100 μ L de EDC

(solução estoque 50 mM) e de NHS (solução estoque 75 mM) foram adicionadas em 1 mL de AuNP-MUA, e a mistura reagiu por 30 min sob baixa agitação (100 rpm) à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, alíquotas contendo 2.5 μg / mL de cada peptídeo foram inseridas e a mistura reagiu por 30 minutos. Nesse intervalo, as aminas primárias dos peptídeos interagiram com o ácido carboxílico previamente ativado (EDC/NHS), formando uma ligação amida. Ao final dos últimos 30 minutos, as moléculas dos peptídeos que não se ligaram foram removidas por centrifugação (16.873 g, 20 min) e dosadas por fluorescência (excitação 229 nm e emissão 350-500 nm). A quantidade de peptídeos imobilizados nas AuNP foi calculada subtraindo a concentração inicial da concentração final detectada no sobrenadante.

4.5 Caracterização dos coloides

4.5.1 Espectrometria UV-vis

A espectroscopia UV-vis compreende a análise da absorbância de luz por uma amostra. Diferentes comprimentos de ondas eletromagnéticas na região ultravioleta e visível (UV-vis; 190nm a 800nm) incidem na amostra, sendo a quantidade de luz absorvida calculada pelo espectrofotômetro. Dividindo a intensidade da luz antes de passar pela amostra (I_0) e a intensidade da luz depois de atravessá-la (I), tem-se a transmitância da amostra (I / I_0).

A espectrometria UV-vis foi utilizada para monitorar a formação de AuNPs, a modificação de sua superfície com MUA, e as imobilizações dos peptídeos via atração eletrostática e ligação covalente, através bandas plasmônicas formadas. Utilizou-se o espectrofotômetro EvolutionTM300, da Thermo, alocado no Labiom/UFES. Os espectros na região do UV-vis foram feitos posicionando duas cubetas de quartzo com capacidade volumétrica de 1 mL no espectrofotômetro. Numa das cubetas de quartzo, colocou-se água MiliQ como branco, enquanto na outra cubeta depositaram-se as suspensões coloidais. Todos coloides de AuNP-citrato e AuNP-MUA com os respectivos peptídeos conjugados foram analisados à temperatura ambiente (25°C), e a varredura da absorbância foi realizada no intervalo de 800 a 300 nm com resolução de 1nm.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para se avaliar a distribuição de tamanho dos coloides antes e depois da conjugação. As imagens das AuNPs foram obtidas com equipamento JEM-1400, JEOL, USA inc., operado a 120 kV. Para o preparo da amostra, cerca de 300 μ L da suspensão coloidal foram depositados sobre uma lâmina de vidro seca e previamente limpa com lenço de papel. A amostra foi deixada em repouso à temperatura ambiente (25°C) até o surgimento de um halo de partículas concentradas na borda do líquido. Depois, esfregou-se sutilmente uma grade de cobre, com 400 mesh, revestida com polímero formvar sobre toda extensão do halo. Detalhes

4.5.3 Espectrometria vibracional no infravermelho com Transformada de Fourier

As medidas de FTIR para as AuNPs e seus respectivos conjugados foram obtidas a fim de monitorar as ligações formadas nas etapas de síntese, modificação com MUA e bioconjugação com os peptídeos sintéticos. Para o preparo das amostras, 50 mL de cada suspensão coloidal foram centrifugadas (16.870 g, 20 min), seu sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em água miliQ. O volume final deste foi depositado numa placa vítrea de Petri previamente limpa e seca, a qual foi acondicionada em estufa à 60°C por 24h. Após esta etapa, o sólido no assoalho da placa foi raspado com lâmina estéril e submetido à análise vibracional da espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

4.5.4 Espectrometria Raman

A espectrometria Raman foi utilizada em todas as etapas de síntese, modificação e bioconjugação das AuNPs a fim de identificar as moléculas adsorvidas ou próximas à superfície coloidal, tendo em vista o efeito de intensificação de espalhamento Raman por meio de superfície (SERS) metálica. Assim, uma alíquota de 2 mL do coloide foi centrifugada (16.870 g, 20 min), seu sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em água miliQ. Em seguida, instilou-se 1 mL desta suspensão sobre uma lâmina de vidro higienizada conforme descrições anteriores. A amostra permaneceu em estufa a 60°C até a secagem completa.

A análise Raman foi realizada em Microscópio Confocal ALPHA 300R acoplado com espectrômetro Raman. O intervalo de leitura do espalhamento Raman foi de 500 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} com laser de 532 nm.

4.5.5 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Utilizou-se o espalhamento de luz dinâmico para medir o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas sintetizadas, modificadas com MUA e bioconjugadas, tendo em vista a distribuição de tamanho da partícula em função de intensidade, área, volume e quantidade. alíquotas de 2 mL do coloide foram adicionadas numa cubeta de teflon.

4.5.6 Potencial Zeta (PZ)

Para a análise da carga superficial das AuNP, foi utilizado o Analisador de Tamanho de partículas (Microtrac, Zetatrac NPA152). Assim, alíquotas de 2 mL do coloide foram adicionadas numa cubeta de teflon ladeadas por um par de eletrodos de paládio que afere a mobilidade eletroforética das partículas coloidais à temperatura ambiente (25°).

4.5.7 Teste de floculação

Para determinar a concentração mínima de eletrólitos que desestabiliza as AuNP-cit e as AuNP-MUA, alíquotas de 1 mL de AuNP-cit e de AuNP-MUA foram misturadas com 10 μL de soluções de NaCl 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM e 250 mM. Os testes foram realizados em triplicada, e a avaliação da estabilidade foi medida por espectroscopia UV-vis.

Os mesmos procedimentos se aplicaram às respectivas biointerfaces (AuNP-DV1, AuNP-DV2, AuNP-DV3, AuNP-DV4; AuNP-MUA-DV1, AuNP-MUA-DV2, AuNP-MUA-DV3 e AuNP-MUA-DV4).

4.5.8 Teste em diferentes faixas de pH

A influência do pH sobre a estabilidade dos coloides (AuNP-cit, AuNP-MUA, e respectivos bioconjugados) foi avaliada. Resumidamente, alíquotas de 1 mL dos coloides foram centrifugadas (16.870 g; 20 min), o sobredante descartado (975 μL) e

o pellet ressuspendido (1 mL) em soluções de pH 3, 5, 7, 9, 11 e 12. Os testes foram realizados em triplicata, e a estabilidade foi aferida por espectroscopia UV-vis.

Os mesmos procedimentos se aplicaram às respectivas biointerfaces (AuNP-DV1, AuNP-DV2, AuNP-DV3, AuNP-DV4; AuNP-MUA-DV1, AuNP-MUA-DV2, AuNP-MUA-DV3 e AuNP-MUA-DV4).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Síntese e Caracterização de Peptídeos

5.1.1 *Prospecção de Banco de Dados*

A proteína NS1 é um dímero de 352 aminoácidos, cujos monômeros constituintes possuem, cada um, 3 domínios proteicos (DARNELL et al., 2012). Durante a prospecção da base de dados para a predição dos epítomos potenciais, foram encontrados 125.780 registros que incluíam sequências no intervalo dos domínios (< 352 aa), assim como da proteína total (352 aa) e da poliproteína inicial (> 352 aa). As sequências dos resíduos de aminoácidos de cada isoforma de NS1 DENV utilizadas neste estudo estão descritas adiante no formato FASTA, tendo os fragmentos sintetizado em destaque (Figura 5).

Convém ressaltar que o mapa das regiões potencialmente imunogênicas de cada isoforma da NS1 DENV foi gerado pelo software Protean 3D®. Seu algoritmo de predição dos epítomos lineares se baseia num conjunto de dados (hidropaticidade, estrutura secundária, flexibilidade e outros) de peptídeos cuja antigenicidade tenha sido caracterizada experimentalmente. Cálculos dessas características são implementados para descrever as propriedades locais de cada peptídeo e criar o modelo de aprendizado de máquina. Em outras palavras, os resultados obtidos em bancada são convertidos em modelos probabilísticos ou combinatórios para prever as características de uma dada proteína (OLIVEIRA et al., 2017).

O mapa fornecido pelo programa se vale da predição da hidrofiliidade (colunas em azul) dos resíduos de aminoácidos na NS1 DENV1 (Figura 6-9) a partir da escala de Kyte-Doolittle, designando alguns peptídeos potencialmente imunogênicos (colunas em rosa), os quais têm por base o índice antigênico de Jameson-Wolf. Normalmente, os fragmentos de aminoácidos considerados imunogênicos se distribuem por toda extensão primária da proteína, podendo estar, às vezes, em locais tridimensionalmente inacessíveis aos anticorpos. Posto que nem todos os sítios antigênicos estão localizados nas regiões da superfície externa da NS1, a predição

da acessibilidade superficial dos determinantes antigênicos da proteína (colunas em amarelo) foi definida segundo a escala de Emini.

NS1 DENV1

1	DSGCVINWKG	RELKCGSGIF	VTNEVHTWTE	QYKFQADSPK	RLSAAIGKAW	EEGVCGIRSA
61	TRLENIMWKQ	ISNELNHILL	ENDMKFTVVV	GDVSGILAQG	KKMIRPQPME	HKYSWKSWSGK
121	AKIIGADVQN	TTFIIDGPNT	PECPDNQRAW	NIWEVEDYGF	GIFTTNIWLK	LRDSYTQVCD
181	HRLMSAAIKD	SKAVHADMGY	WIESEKNETW	KLARASFIEV	KTCIWPKSHT	LWSNGVLESE
241	MIIPKIYGGP	ISQHNYPGY	FTQTAGPWHL	GKLELDFDLC	EGTTVVVDEH	CGNRGPSLRT
301	TTVTGKTIHE	WCCRSC TLPP	LRFKGEDGCW	YGMEIRPVKE	KEENLVKSMV	AS

NS1 DENV2

1	DSGCVVSWKN	KELKCGSGIF	VTDNVHTWTE	QYKFQLESPP	KLASAIQKAH	EEGICGIRSV
61	TRLENLMWKQ	MTPELNHILS	ENEVKLTIMT	GDIKGIMQAG	KRSLRPQPTE	LKYSWKTWKG
121	AKMLSTEAHN	QTFLIDGPET	AECPTNRAW	NSLEVEDYGF	GVFSTNIWLK	LREKQDVFC
181	SKLMSAAIKD	NRAVHADMGY	WIESALNDTW	KMEKAYFIEV	KSCHWPKSHT	LWSNGVLESE
241	MIILKNFAGP	VSQHNYPGY	HTQTAGPWHL	GKLEMDDFDC	EGTTVKVTED	CNRRGPSLRT
301	TTASGKLITE	WCCRSC TLPP	LRYRGEDGCW	YGMEIRPLKE	KEENLVNSLV	TA

NS1 DENV3

1	DMGCVINWKG	KELKCGSGIF	VTNEVHTWTE	QYKFQADSPK	RLATAIAGAW	ENGVCGIRST
61	TRMENLLWKQ	IANELNYILW	ENNIKLTVVV	GDTLGVLEQG	KRTLTPQPME	LKYSWKTWKG
121	AKIVTAETQN	SSFIIDGPNT	PECPSASRAW	NVWEVEDYGF	GVFTTNIWLK	LREYVTQLCD
181	HRLMSAAVKD	ERAVHADMGY	WIESQKNGSW	KLEKASLIEV	KTCTWPKSHT	LWTNGVLESD
241	MIIPKSLAGP	ISQHNYPGY	HTQTAGPWHL	GKLELDFNYC	EGTTVVITES	CGTRGPSLRT
301	TTVSGKLIHE	WCCRSC TLPP	LRYMGEDGCW	YGMEIRPISE	KEENMVKS LV	AS

NS1 DENV4

1	DMGCVASWSG	KELKCGSGIF	VVDNVHTWTE	QYKFQPESPA	RLASAILNAH	KDGVCGIRST
61	TRLENVMWKQ	ITNELNYVLW	EGGHDLTVVA	GDVKGVLTKG	KRALTPPVSD	LKYSWKTWKG
121	AKIFTPEARN	STFLIDGPD	SECPNERRAW	NSLEVEDYGF	GMFTTNIWMK	FREGSSEVCD
181	HRLMSAAIKD	QKAVHADMGY	WIESSKNQW	QIEKASLIEV	KTCLWPKTH	LWSNGVLESQ
241	MLIPKSYAGP	FSQHNYPGY	ATQTVGPWHL	GKLEIDFGEC	PGTTVTIQED	CDHRGPSLRT
301	TTASGKLVTQ	WCCRSC TMPP	LRFLGEDGCW	YGMEIRPLSE	KEENMVKSQV	TA

Figura 5: Sequência linear dos 352 aminoácidos que formam a proteína NS1 DENV, conforme o sorotipo do vírus dengue. Os intervalos destacados correspondem às porções imunogênicas preditas e posteriormente sintetizadas.

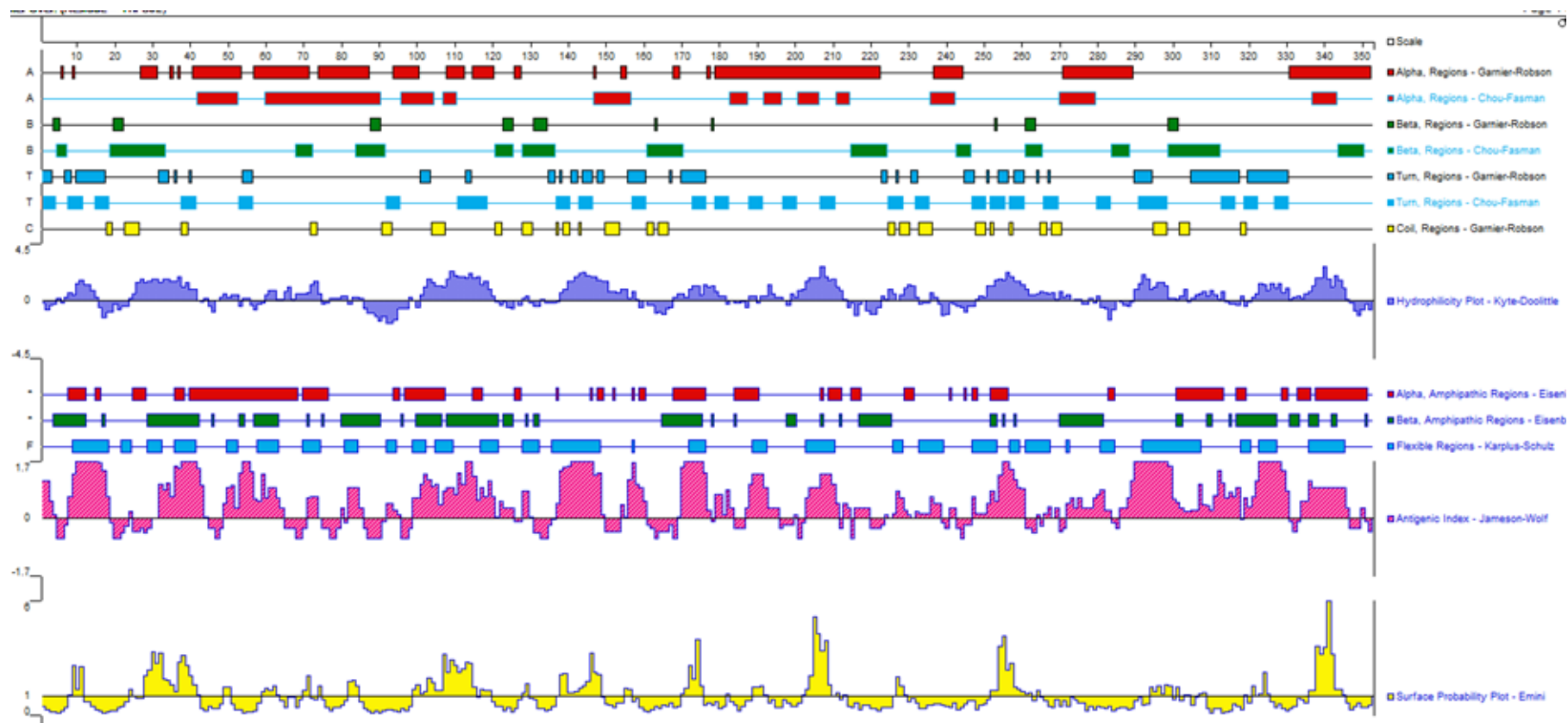


Figura 6: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 1.

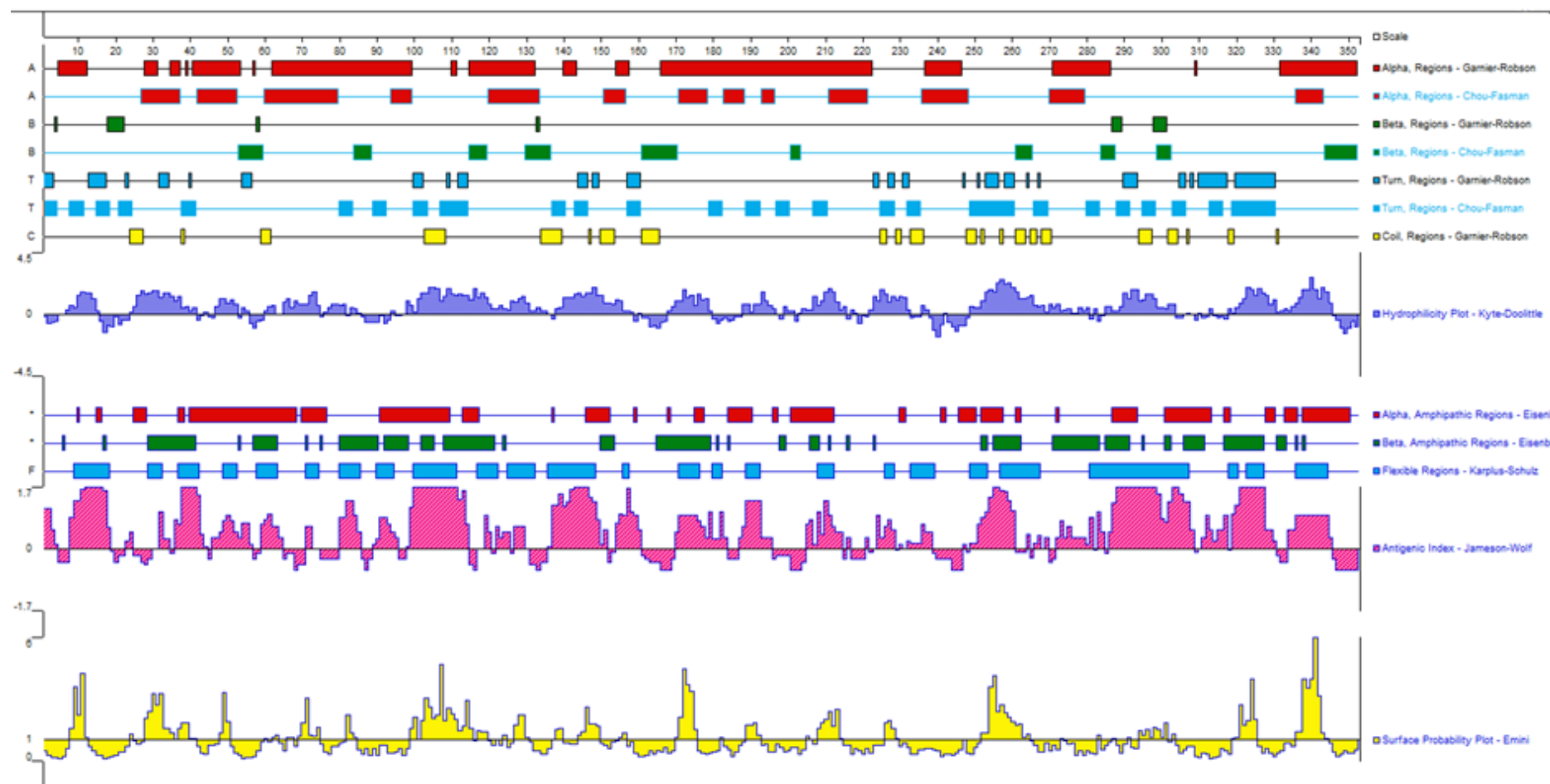


Figura 7: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 2.

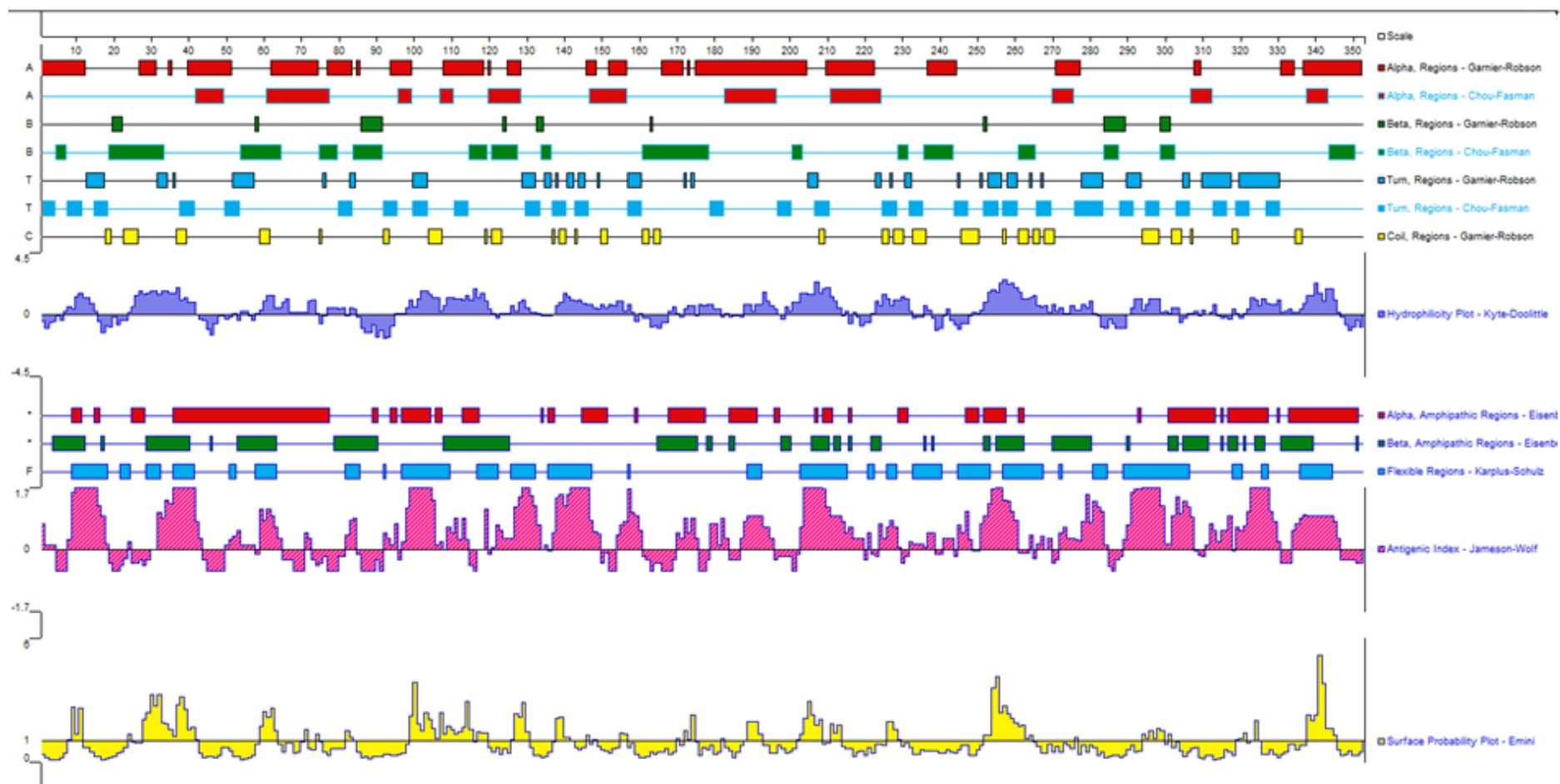


Figura 8: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 3.

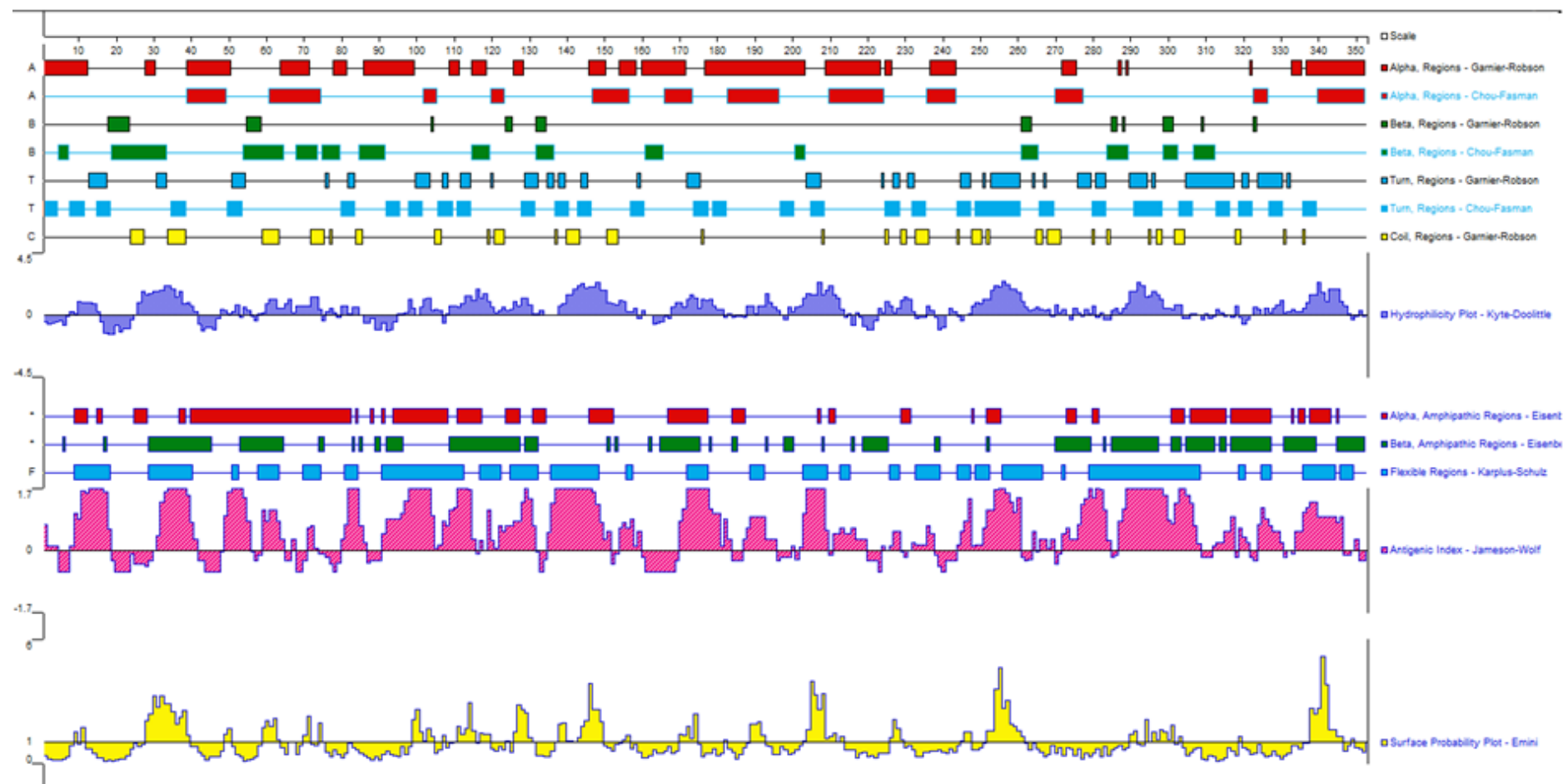


Figura 9: Mapa do perfil imunogênico da NS1 DENV 4.

5.1.2 Alinhamento das sequências

As sequências preditas I, II e IV apresentaram compatibilidade total com suas respectivas isoformas de NS1 e congêneres associados (poliproteínas de cada sorotipo), exibindo valores de *score* e *Expected* satisfatórios. Entretanto, o fragmento predito para a NS1 DENV3 foi o único a apresentar similaridade cruzada com uma sequência que não pertence ao vírus da Dengue. Cerca de 70 % dos aminoácidos deste, dispostos naquela ordem sequencial, geraram um *score* de 24.3 com E de 0.013 de semelhança com *Lepidothrix coronata* (Figura 10). Este é uma ave popularmente chamada de "Uirapuru-de-chapéu-azul", cujo genoma foi igualmente deduzido por bioinformática. Até então, não há registro de doenças humanas correlacionadas a ave.

Dessa maneira, nenhuma combinação entre os fragmentos preditos com proteínas não relacionadas à NS1 DENV foi encontrada. Isso demonstra que, a princípio, os anticorpos antipeptídeos que venham a ser produzidos irão reconhecer apenas os antígenos NS1 DENV.

5.1.3 Caracterização dos peptídeos

A análise por espectrometria de massas do produto sintético bruto evidenciou a superabundância dos peptídeos sintéticos. Por exemplo, a massa molecular do pNS1 DENV1, obtida por deconvolução do seu espectro, foi de 2.783 Da (~2,8 KDa) (Figura 11); e do pNS1 DENV2 foi de 1.958 Da (~1,9 KDa) (Figura 12).

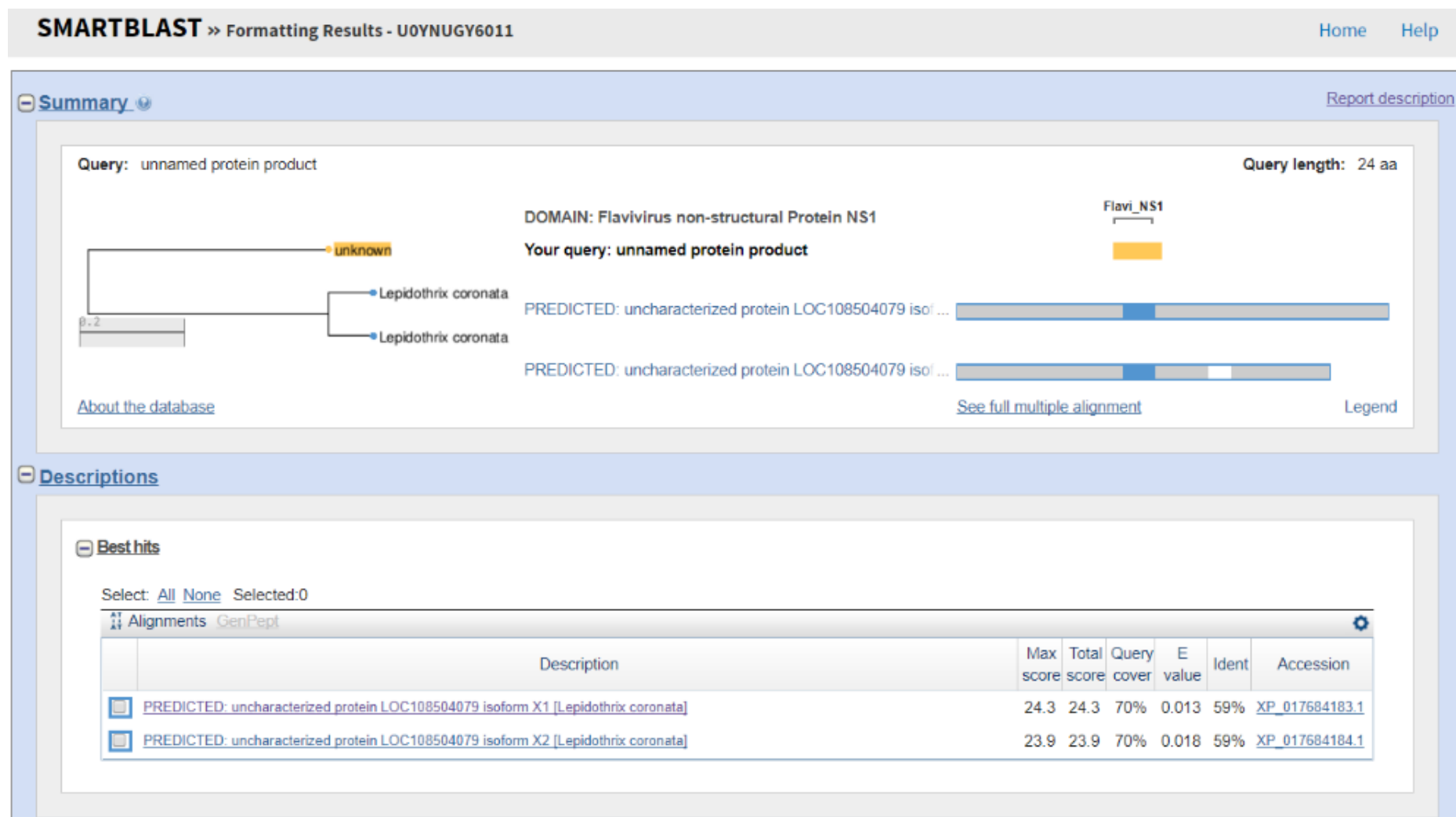


Figura 10: Informações geradas pelo BLAST para a sequência predita da NS1 oriunda do vírus dengue tipo 3.

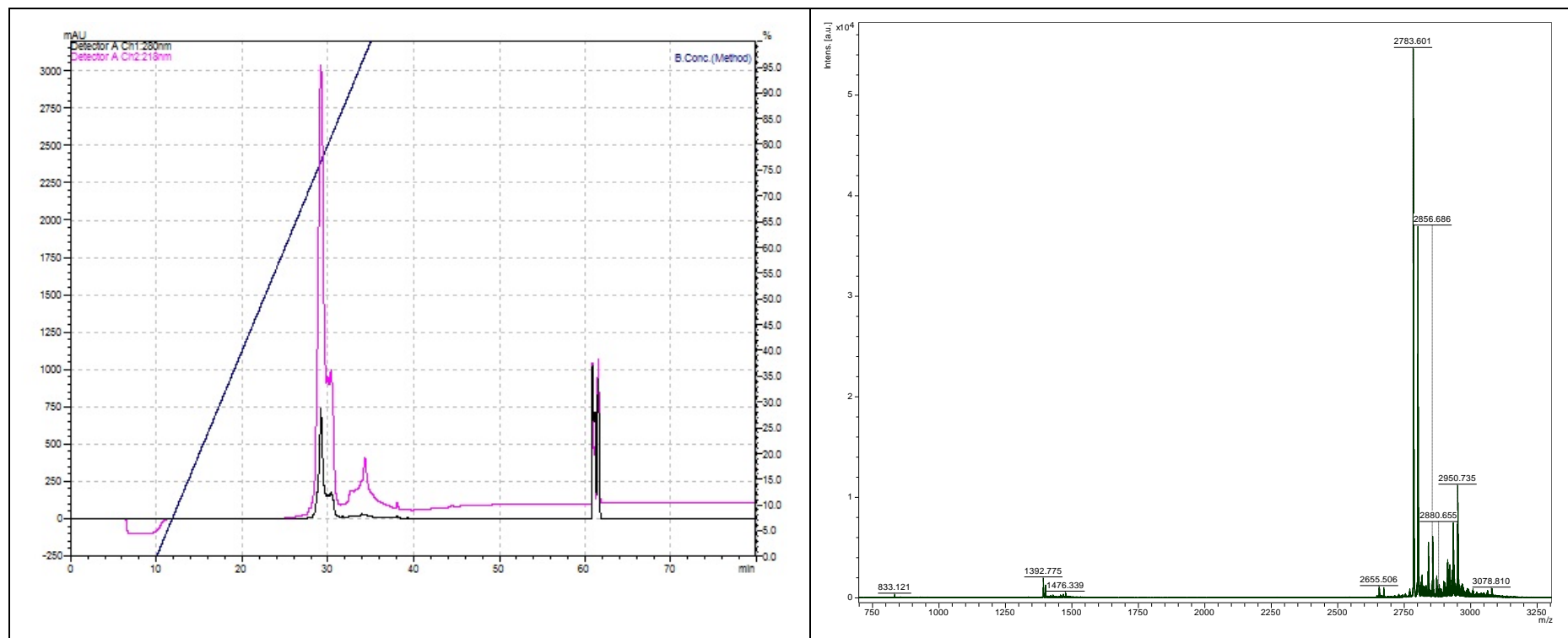


Figura 11: Espectro obtido por espectrometria de massas do pNS1 DENV1 bruto.

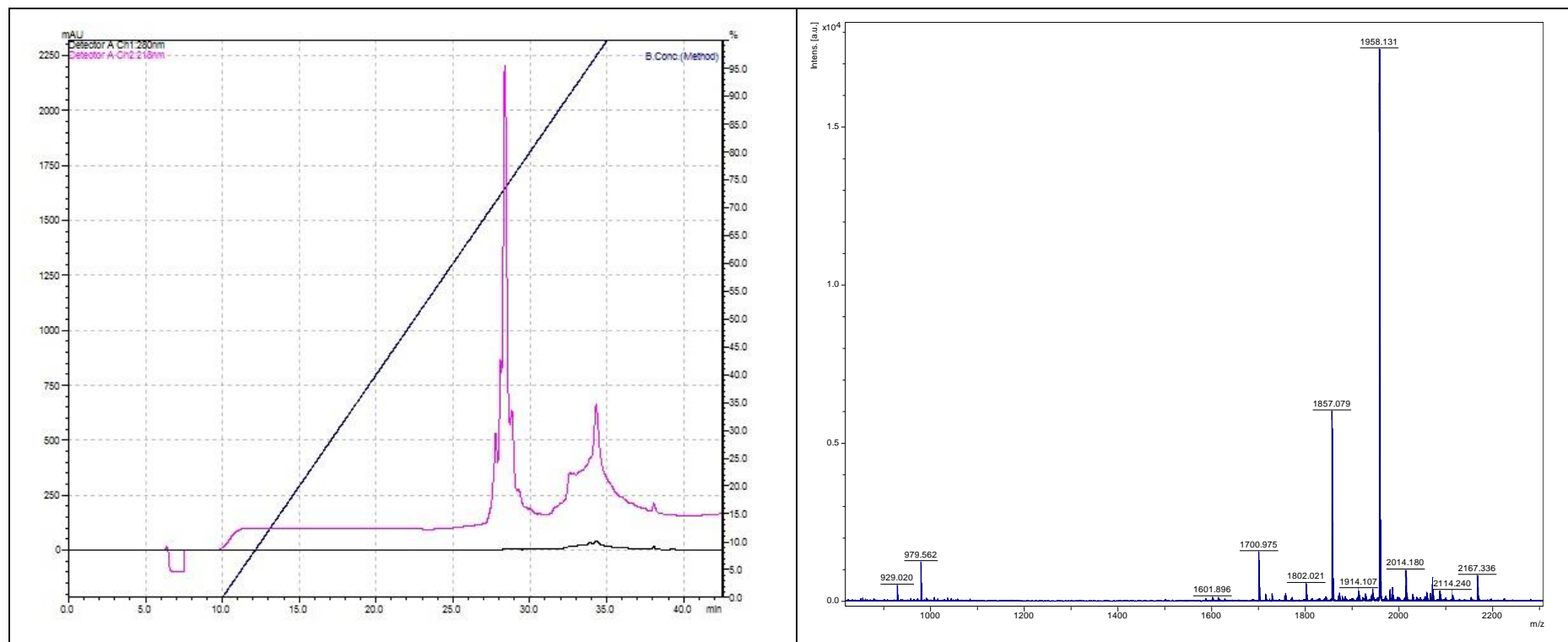


Figura 12: Espectro obtido por espectrometria de massas do pNS1 DENV2 bruto.

5.2 Síntese e caracterização de Nanopartículas de ouro

Diversos agentes redutores podem reduzir o sal de ouro, como o peróxido de hidrogênio, alcanotóis, borohidreto de sódio, citrato de sódio e outros. Aqui, o citrato de sódio foi escolhido pela rapidez e facilidade com que forma as AuNPs após sua adição. Ressalta-se que a proporção do citrato de sódio deve ser corretamente quantificada para evitar alterações nas características da síntese (HAISS et al., 2007). Aqui, as AuNPs sintetizadas com citrato de sódio apresentaram coloração vermelho-rubi, e foram analisadas por espectrofotometria UV-vis. O espectro de absorção gerado decorre do confinamento quântico das AuNPs, ocasionando o aparecimento das bandas plasmônicas de superfície

Para nanopartículas metálicas, o comprimento de onda da absorbância máxima (λ máx) e a largura de banda a meia altura indicam o tamanho, o formato e a dispersão das nanopartículas num sistema coloidal. O λ máx para AuNPs está no intervalo de 500 a 600 nm, sendo proporcional à concentração (DING et al., 2012), enquanto os deslocamentos batocrômico e hipsocrômico configuram variações no tamanho e aglomeração das partículas (COLANGELO et al., 2016; KAUSAITE-MINKSTIMIENE et al., 2010; ZONG; COBB; CAMERON, 2017). A leitura UV-vis para as AuNPs reduzidas com citrato revela uma banda de absorção centrada em 522 nm (Figura 13).

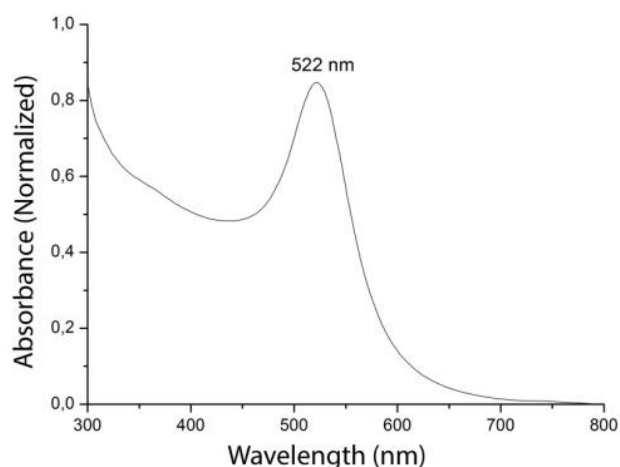


Figura 13: Espectroscopia de absorção no UV-visível da síntese de nanopartículas de ouro usando citrato de sódio como agente redutor.

5.3 Bioconjugação dos peptídeos com AuNPs

5.3.1 Interação eletrostática

A imersão de peptídeos em soluções de pH 0.5 acima do ponto isoelétrico (pI) de cada biomolécula sintética permite que estas sejam complexadas com matrizes inorgânicas. Essa abordagem relativamente simples possui limitações que incluem desde a necessidade de concentrações elevadas de peptídeos, o quais são imobilizados sob orientação aleatória, até a desnaturação e pouca reprodutibilidade.

A partir da observação dos espectros (Figura 14), constata-se a ocorrência de deslocamento batocrômico após a conjugação dos peptídeos baseados nos sorotipos I, III e IV. Essa mudança na banda de absorção é menos expressiva do que a encontrada em testes com proteínas de maior peso molecular. Tal aspecto é devido ao tamanho diminuto dos peptídeos avaliados (< 2 nm), que pouco altera a mobilidade dos elétrons livres na interface metálica. Contudo, o peptídeo do sorotipo II (Figura 14B) não promoveu descolamento óptico, evidenciando a inexistência de interação.

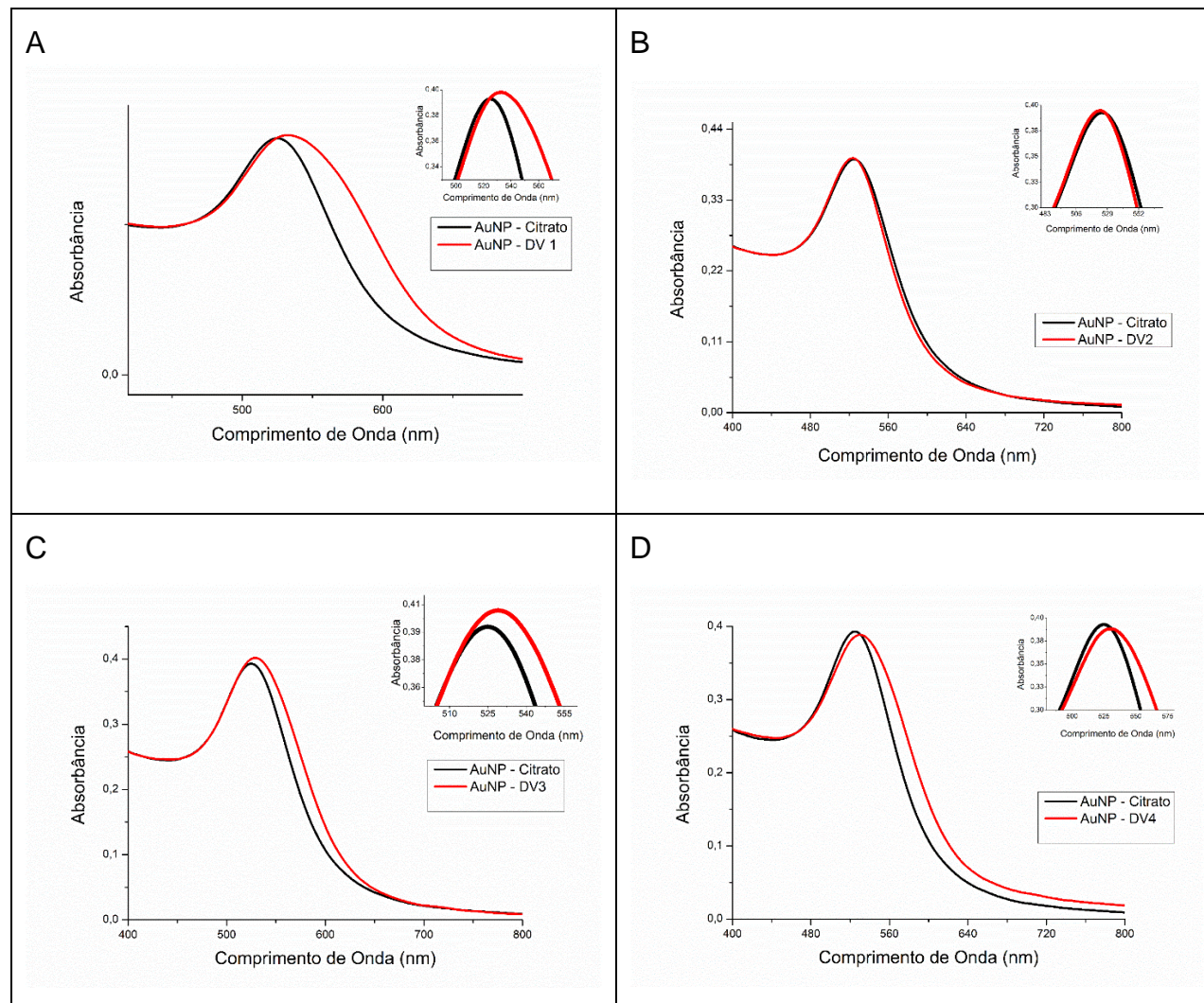


Figura 14: Espectros de absorvância dos ensaios de interação eletrostática.

5.3.2 Acoplamento covalente

A utilização conjunta dos reagentes EDC/NHS com o 3-ácido mercaptundecanóico (MUA) para unir biomoléculas e matrizes inorgânicas é bem difundida na literatura. O mecanismo desta reação química está retratado na Figura 15: **Reações químicas possíveis com EDC e NHS.**, e ocorre da maneira seguinte:

Forma-se uma ligação covalente entre o grupo sulfeto do MUA e o ouro, disponibilizando o radical ácido carboxílico para a reação com o EDC e o NHS. Inicialmente, o EDC reage com a carboxila levando à formação do grupo intermediário o-acilisouréia, que é instável e reativo. Com isso, a reação pode evoluir para três rotas distintas: 1) se houver uma amina primária disponível para reagir, esta interage com o grupo carboxílico do MUA produzindo uma ligação amida com liberação de um derivado solúvel de uréia. 2) o NHS adicionado se liga ao radical carboxílico, formando um grupo reativo mais estável do que o o-acilisouréia; 3) o intermediário o-acilisouréia hidrolisa se não reagir imediatamente, restaurando a carboxila original. Ao combinar o uso dos reagentes EDC/NHS, as carboxilas ativadas do MUA permanecem conservadas até que o NHS seja deslocado por aminas primárias das biomoléculas.

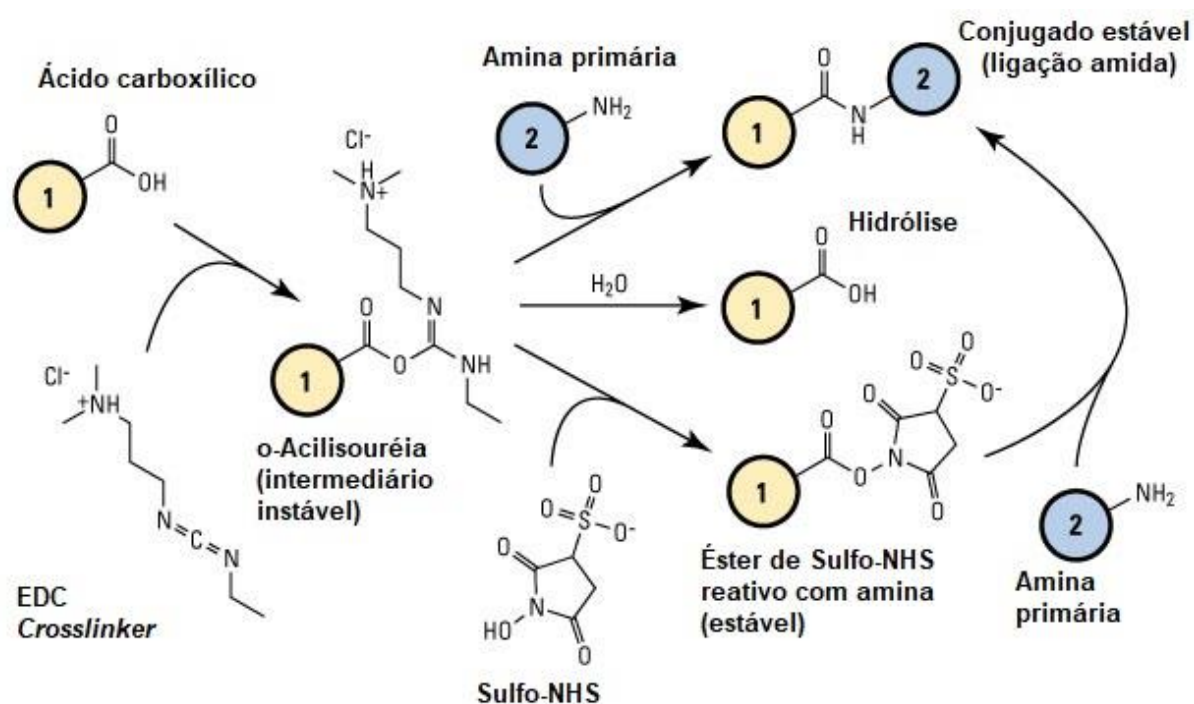


Figura 15: Reações químicas possíveis com EDC e NHS.

A construção da nanobiointerface utilizando o protocolo EDC/NHS pode ser confirmada através das espectrometrias UV-vis (Figura 16), Raman e FTIR indicadas adiante. Conforme descrição prévia, as AuNPs sofreram alterações na sua absorção e espalhamento de luz a cada modificação dos compostos superficiais, indicando êxito na ligação das moléculas desejadas. Neste caso, cada nova inserção de substâncias ocasionou o deslocamento batocrômico da RPSL da AuNPs.

Segundo dados do ProtParam, o balanço residual de cargas indica que os peptídeos utilizados possuem carga superficial positiva. A mudança na eletrocinética das AuNP-MUA após o acoplamento covalente pode ser explicada pela presença de peptídeos ligados na superfície. Dessa maneira, o acoplamento de peptídeos via MUA/EDC/NHS se mostra mais adequado para construção de nanobiointerfaces imunogênicas.

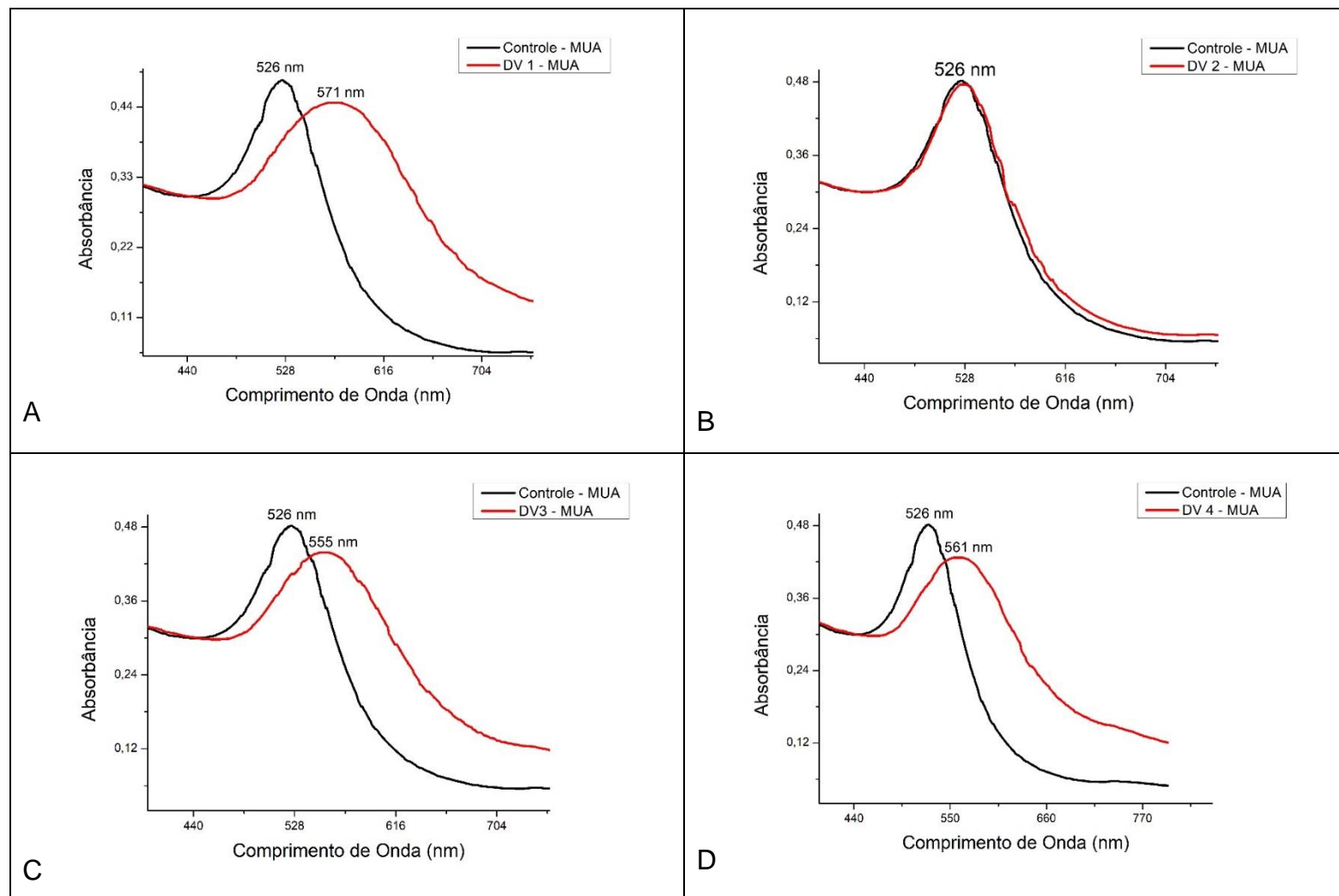


Figura 16: Espectros de absorbância dos ensaios de interação eletrostática.

5.4 Caracterização

5.4.1 Espectrometria UV-vis

Obtiveram-se os espectros de absorbância para cada coloide e seus respectivos bioconjugados no intervalo de comprimento de onda entre 800nm a 200nm. As medidas de UV-vis indicam a ligação do MUA e/ou imobilização de peptídeos na superfície coloidal, tendo em vista o deslocamento batocrômico do lambda máximo da AuNP. Isso é devido a mudanças na mobilidade dos elétrons livres das AuNP, ocasionando mudanças nos picos da RPSL, a qual varia de acordo com tamanho das AuNPs. Assim, o valor do lambda máximo obtido para as AuNP-citrato centrou em 522nm, típico de coloides de ouro com 20nm (± 2 nm) de diâmetro (BEHZADI et al., 2015).

Após a modificação da superfície das AuNP-citrato por MUA, e de ambos ensaios de bioconjugação com os peptídeos, houve deslocamento batocrômico do lambda máximo, sugerindo uma interação entre as AuNPs com as moléculas do MUA e/ou dos peptídeos sintéticos. Quaisquer moléculas adsorvidas ou desorvidas na superfície metálica altera o índice de refração do coloide devido ao aumento ou à redução de camadas da superfície da AuNP.

Os resultados da Figura 17 mostram o espectro UV-vis das AuNPs-citrato, AuNP-MUA e os suas respectivas versões bioconjugadas com os peptídeos. A análise do espectro demonstra que a inserção do MUA desloca lambda máx de 522 nm para para 526, corroborando o êxito na etapa modificação. Provavelmente, esse deslocamento hipsocrômico decorre do tratamento aplicado ao coloide depois da reação de modificação. Os deslocamentos também aconteceram, em maior ou menor grau, nas respectivas bioconjugações com os peptídeos (figura Cit-pepts e MUA-pepts). As mudanças na amplitude do sinal da RPSL possivelmente decorrem de alterações no revestimento superficial das AuNPs após a centrifugação e ressuspensão das nanobiointerfaces para remover os peptídeos que não se ligaram, alterando a concentração das AuNPs. Devido a isso, quaisquer mudanças analisadas na amplitude da banda plasmônica dificultaria distinguir se foram causadas pela adsorção

dos peptídeos na superfície dos coloides ou se provêm de mudanças na concentração das AuNPs.

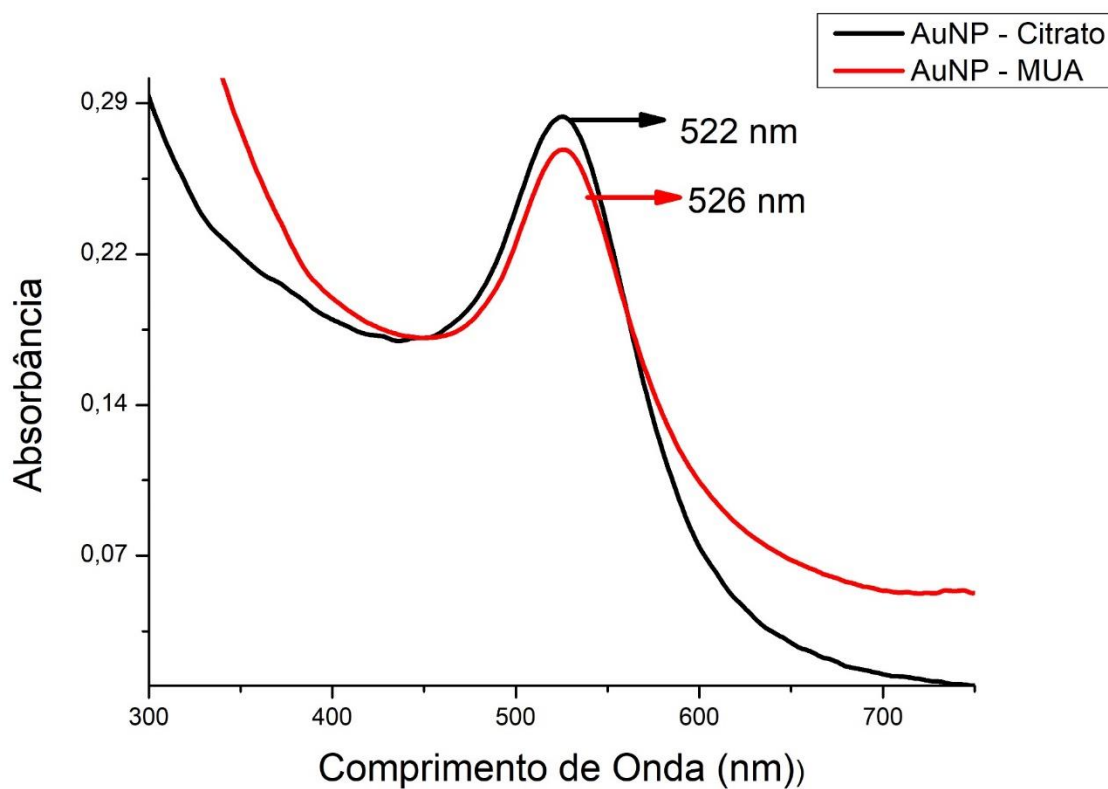


Figura 17: Deslocamento hipsocrômico e efeito batocrômico das AuNPs após modificação.

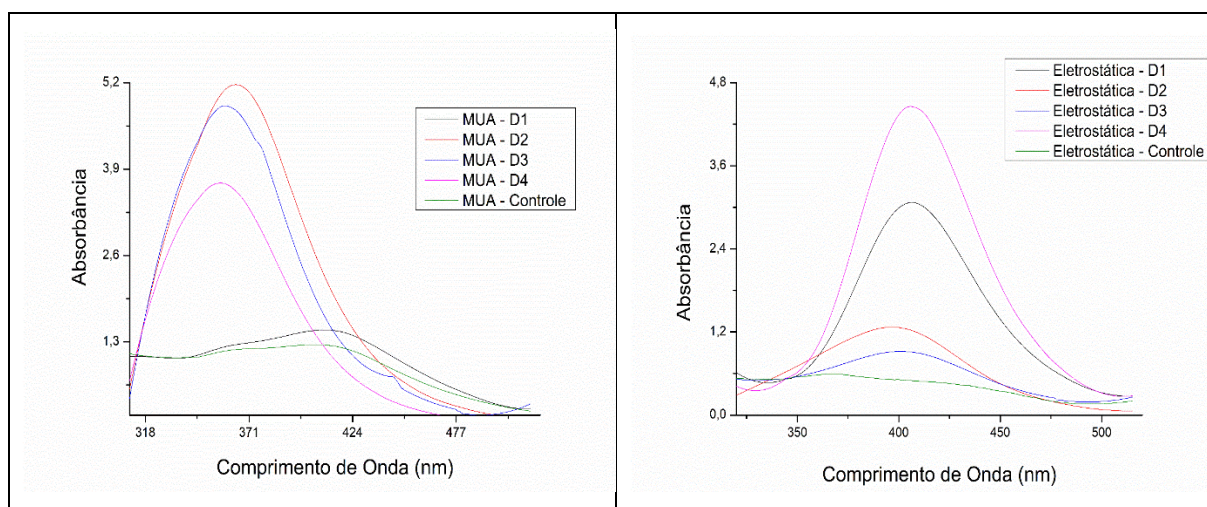


Figura 18: Espectros da dosagem do sobrenadante das conjugações (à esquerda) com AuNP-MUA e (à direita) com AuNP-citrato.

Por meio das leituras espectrofotométricas, calculou-se a quantidade de peptídeos presentes nos sobrenadantes (Figura 19) a fim de estimar a quantidade de ligantes sintéticos imobilizados na superfície metálica. Avaliando esses dados, nota-se maior eficiência de conjugação entre as AuNPs-MUA com os peptídeos I, III e IV. Contudo, o peptídeo 2 praticamente não adsorveu à superfície da AuNPs-MUA. Isto foi reafirmado nas análises espectrométricas subsequentes.b

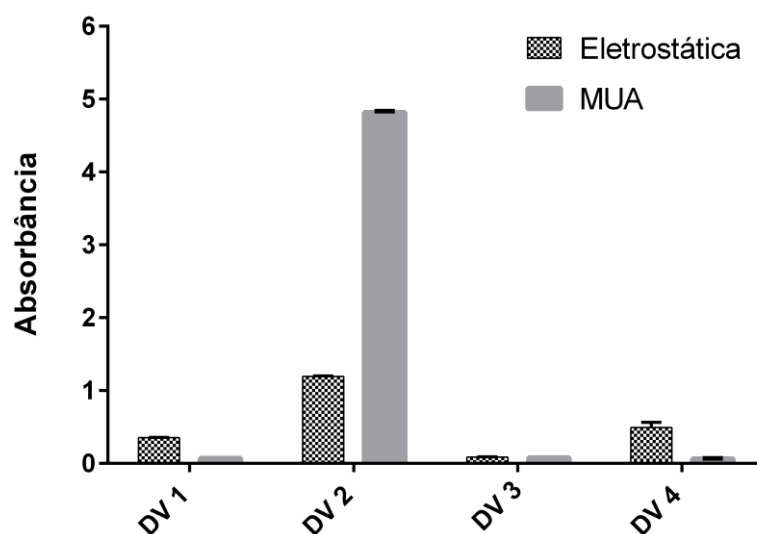


Figura 19: Comparação da quantidade dos peptídeos dosados nos sobrenadantes de ambas estratégias de bioconjugação com os peptídeos.

5.4.2 Microscopia eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão forneceu imagens que revelaram certos aspectos da natureza dos coloides e dos respectivos bioconjugados. As imagens mostram as AuNPs (citrato e MUA) antes e após a conjugação. Constam-se formatos que variam desde quasi-esféricos, a triângulos e estrutura oval. Isso denota a versatilidade de estruturas cristalinas das nanopartículas.

Após a conjugação, observa-se um efeito notável nas imagens do MET. Esta revelou uma camada ora delgada ora espessa circunjacente às AuNPs, que estava ausente antes do tratamento. Este fenômeno também foi relatado por (DOANE et al., 2012). Esta camada é densa o suficiente para detecção por DLS, que mede o tamanho hidrodinâmico. Curiosamente, a espessura desta camada é disforme nos entornos das

AuNPs. Isso pode ser devido ao tratamento aplicado ou à conveniente imobilização dos peptídeos em diferentes planos cristalinos do ouro. Dessa maneira, as imagens de MET permitiram visualizar os coloides individualmente.

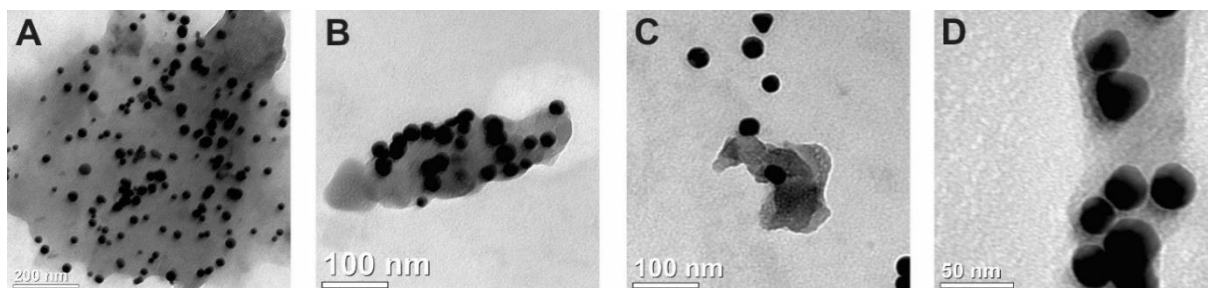


Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNPs-MUA-DV3.

5.4.3 DLS e Potencial Zeta

O espalhamento de luz dinâmico mede a luz espalhada por partículas em soluções. Como a intensidade da luz espalhada é proporcional ao tamanho da partícula, estas que forem maiores produzirão sinais melhores do as partículas menores. Assim, um baixo percentual de aglomerados terá uma intensidade de sinal maior comparada com ampla proporção de partículas menores. Uma vantagem da técnica DLS é que as amostras podem ser analisadas rapidamente em solução para determinar se as AuNPs e bioconjugados estão agregados ou não.

Os resultados obtidos das medidas do tamanho hidrodinâmico das AuNPs por meio do espalhamento de luz são mostrados nas Figura 22. A adsorção dos peptídeos na superfície das AuNPs foi confirmada pela realização das medidas de tamanho, antes e depois das conjugações, a fim de verificar que houve um aumento no diâmetro hidrodinâmico após a conjugação e para monitorar quaisquer adversidades no coloide.

A estabilidade coloidal também foi realizada pelo potencial zeta e os resultados da carga de superfície são apresentados na Figura 21. Nota-se uma inversão da carga superficial para os bioconjugados DV1 e DV4 gerados por atração eletrostática. Esse perfil de cargas foi obtido em todas os conjugados por ligação covalente. De um modo geral, as nanopartículas com ζ superior a 25 mV ou inferior a -25 mV foram relatadas como estáveis por possuírem repulsão eletrostática suficiente para permanecerem

estáveis em solução (ASLAN; GEDDES, 2007). Sendo assim, as formulações eletrostáticas DV1, DV2 e DV3 são estáveis.

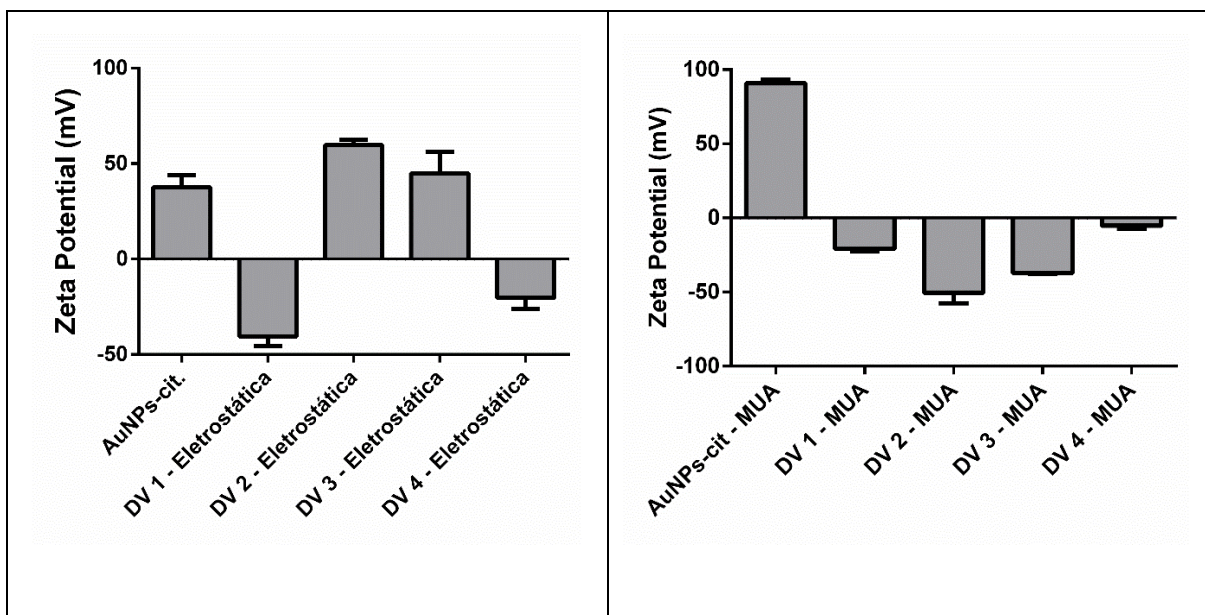
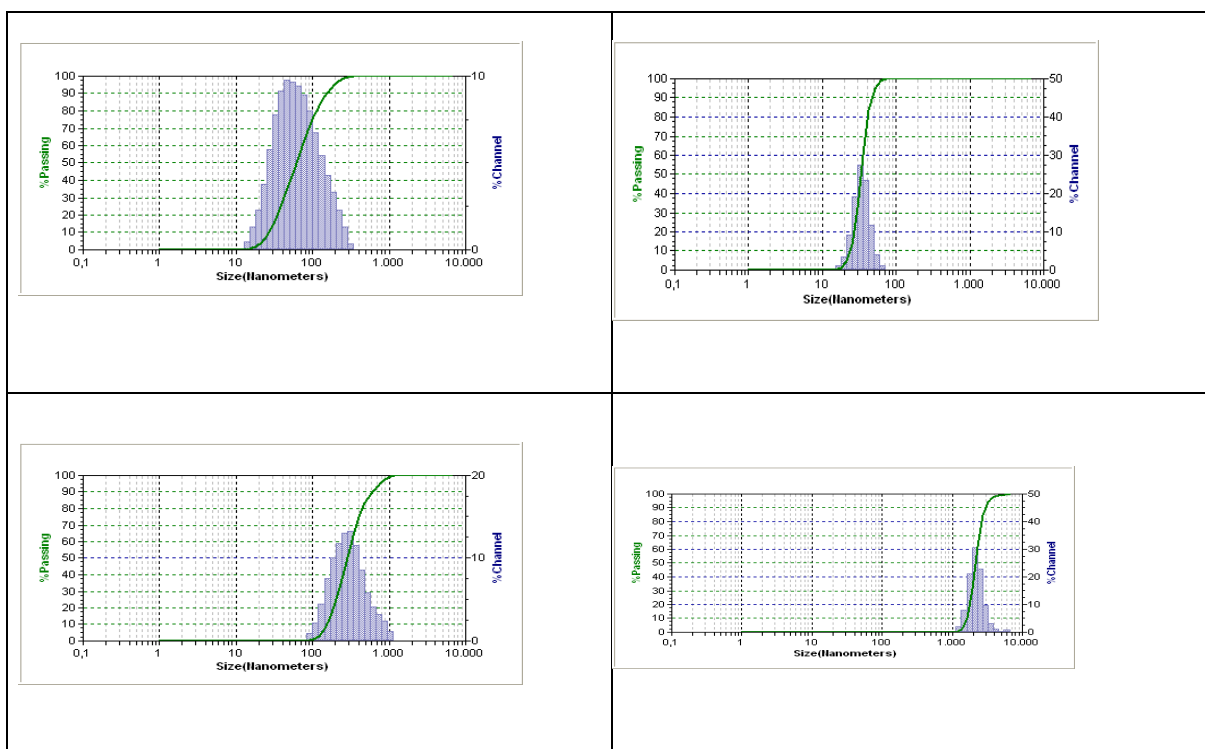


Figura 21: Potencial Zeta das AuNPs não conjugadas e bioconjugações com MUA ou via interações eletrostáticas.



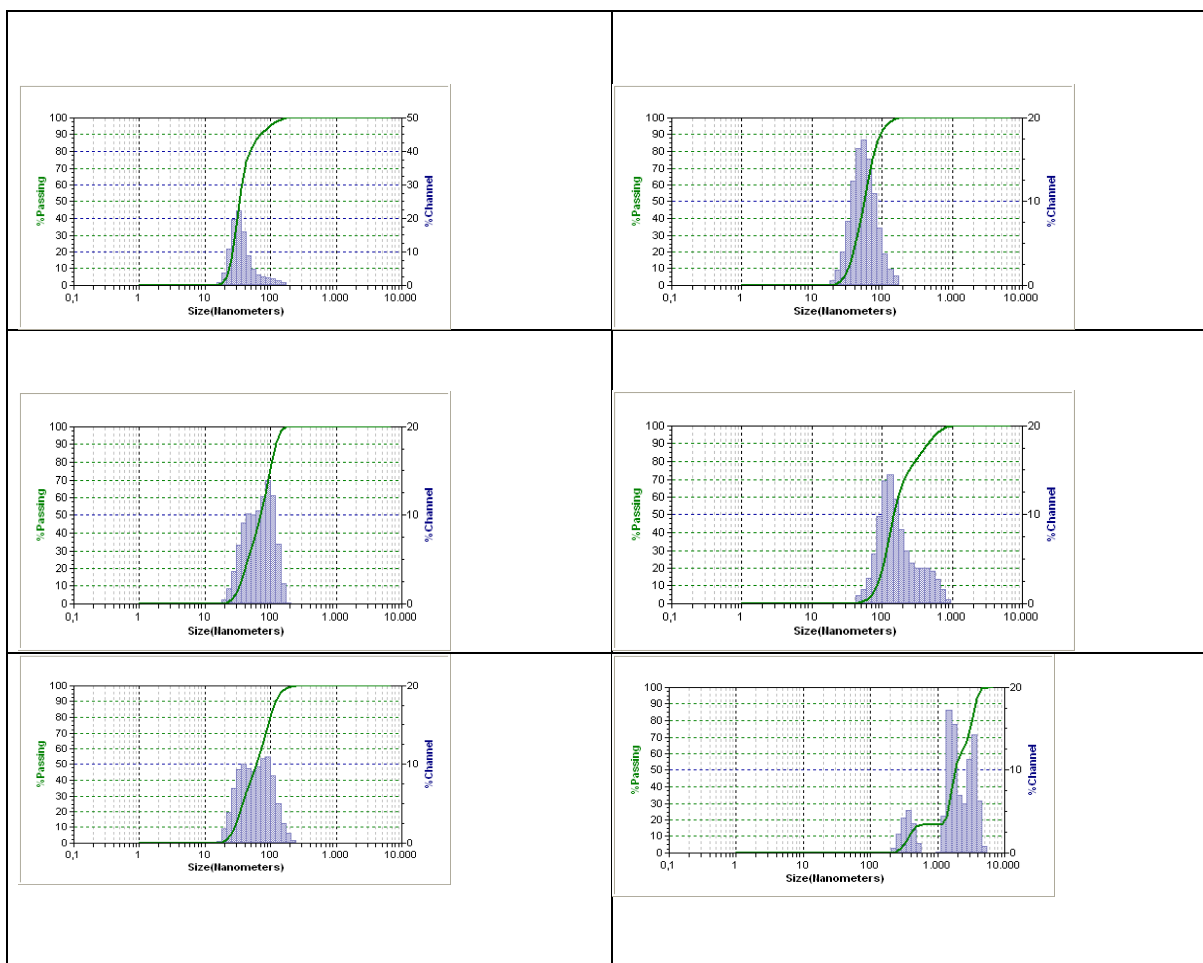


Figura 22: À esquerda, resultados da análise DLS das AuNPs-citrato e subsequentes conjugações. À direita, os mesmos resultados para as AuNPs-MUA.

5.4.4 Espectrometria vibracional no Infravermelho com Transformada de Fourier

A Figura 23 mostra o resultado obtido para o espectro de infravermelho do cristal na região entre $1000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, com os picos facilmente identificados. Nela, estão apresentados para efeito de comparação os espectros infravermelhos do DV - 1, DV - 2, DV - 3, DV - 4 e o controle com MUA utilizando o método com EDC/NHS. É interessante ressaltar a similaridade entre os resultados, contudo é possível notar certas diferenças entre o controle e o tratado, evidenciando a conjugação covalente entre a nanopartículas e os peptídeos.

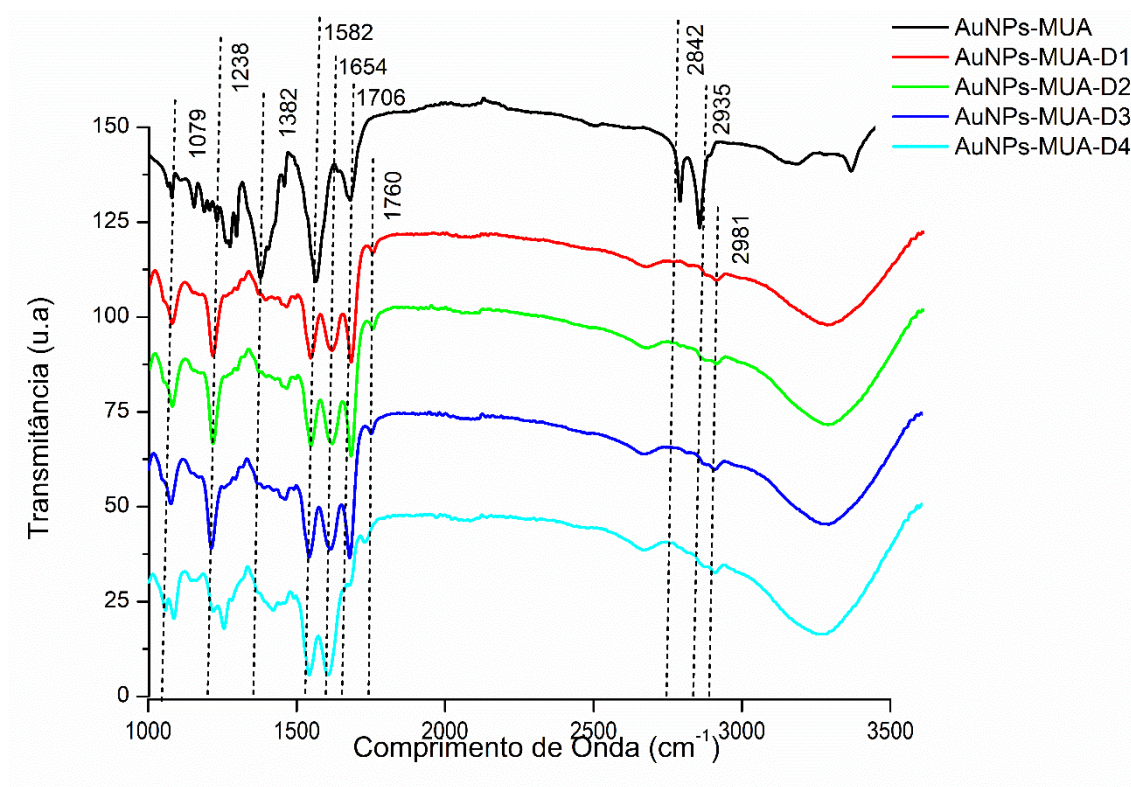


Figura 23: Interferograma dos ensaios aplicados às AuNPs-MUA e bioncojugados.

Os primeiros pontos a serem evidenciados no espectro são localizados em 1240, 1760 e 2981 cm^{-1} . A atenção nesses pontos se deve ao fato destas vibrações estarem presentes em todas as amostras conjugadas com os peptídeos. Esses picos de vibração estão relacionados a presença de ácidos carboxílicos (RCOOH). Os ácidos carboxílicos mostram uma ampla banda de alongamento O-H na faixa de 3300 a 2500 cm^{-1} . A banda de alongamento $\text{C}=\text{O}$ do dímero é observado perto de 1700 cm^{-1} , enquanto a banda de ácido livre é observada em 1760 cm^{-1} . Além disso, os ácidos carboxílicos mostram características de estiramento da ligação C-O e bandas de flexão O-H no plano e fora do plano em 1240, 1430 e 930 cm^{-1} , respectivamente.

Outro ponto a ser destacado é com relação à estrutura centrada em torno da vibração em 1641 cm^{-1} . Essa vibração também está presente em todas as amostras conjugadas com peptídeos. Trata-se, essencialmente, de estiramentos assimétricos do grupo COO^- e deformações simétricas e assimétricas do grupo NH_3^+ , sendo tais grupos responsáveis pelas ligações de hidrogênio (PH) que mantêm a estrutura cristalina. Isso pode explicar a possível formação de agregação pelas ligações peptídicas.

5.4.5 Espectrometria Raman

Os espectros de proteínas exibem bandas de absorção associadas ao seu grupo amida característico. Os modos no plano são devidos ao alongamento C = O, Alongamento C-N, alongamento N-H e flexão O-C-N, enquanto um modo fora do plano é devido à torção C-N. Tais bandas são características dos grupos amida das proteínas. As cadeias de ligações de vibrações são semelhantes às bandas de absorção exibidas por amidas secundárias em geral, e são rotulados como bandas de amida. Existem nove dessas bandas, chamadas amida A, amida B e amidas I-VII, em ordem de número de onda decrescente (Tabela 1).

Tabela 1: Bandas características de amida, presente no espectro de infravermelho de proteínas. De Stuart, B., *Biológico Aplicações de espectroscopia de infravermelho*, série ACOL, Wiley, Chichester, Reino Unido, 1997. Universidade de Greenwich, e reproduzida com permissão da Universidade de Greenwich

TIPO	COMPRIMENTO DE ONDA (CM ⁻¹)	IDENTIFICAÇÃO
A	3300	N-H alongamento em
B	3110	ressonância com 2 amidas
I	1653	80% C=O alongamento; 10% C-N alongamento; 10% N-H dobramento
II	1567	60% N-H dobramento; 40% C-N alongamento
III	1299	30% C-N alongamento; 30% N-H dobramento; 10% C=O alongamento; 10% O=C-N dobramento; 20% outros
IV	627	40% O=C-N dobramento; 60% outros
V	725	N-H
VI	600	C=O
VII	200	C-N

Algumas das bandas são mais úteis para o estudo de conformação do que outros e as bandas amida I e amida II foram os mais utilizados. A banda de amida II representa principalmente (60%) dobramento de N-H, com algum alongamento da ligação C-N (40%) sendo possível dividir a banda amida II em componentes dependendo da estrutura secundária da proteína.

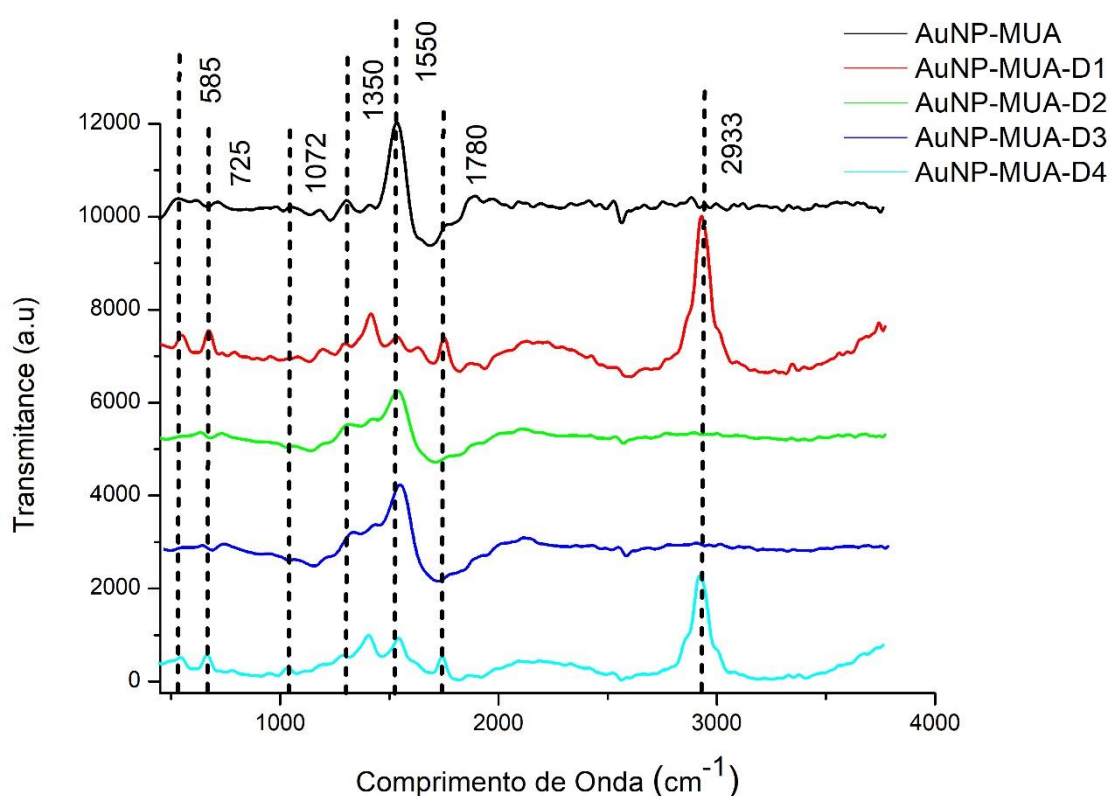


Figura 24: Espectro do espalhamento Raman para as AuNPs-MUA e formas bioconjugadas.

As vibrações que aparecem na região espectral em 725 cm^{-1} estão associadas a ligações peptídicas, de modo a formar um agregado como pode ser visualizado nas imagens de MET Figura 20, o que significa que eles podem fornecer informações importantes sobre a necessidade de revestimento de zonas nuas que gera a formação de ligações peptídicas entre os peptídeos não conjugados.

Também foi observado uma vibração em 2933 cm^{-1} devido ao estiramento simétrico de NH_3^+ , em 2933 cm^{-1} . A banda em 2933 cm^{-1} se caracteriza pela intensidade forte e larga. Esse pico está presente nos peptídeos DV – 1 e DV – 4, os quais apresentaram maior conjugação com o as nanopartículas.

5.4.6 Estabilidade

Para ser útil para aplicações biológicas, AuNP's devem apresentar estabilidade não apenas numa larga faixa de pH, mas também ao longo de diferentes condições de força iônica. Para isso, o parâmetro de floculação (ZHONG; NJOKI; LUO, 2009) foi utilizado, sendo este a integral dos valores de absorção nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm, já que a absorção nesta região é indicativo de agregação dos coloides de citrato (Figura 25) e de MUA (Figura 26). Os resultados de UV-Vis para cada nanobioconjugado em função das variações de pH juntamente com o parâmetro de floculação calculado são apresentados na Figura 27 e na Figura 28.

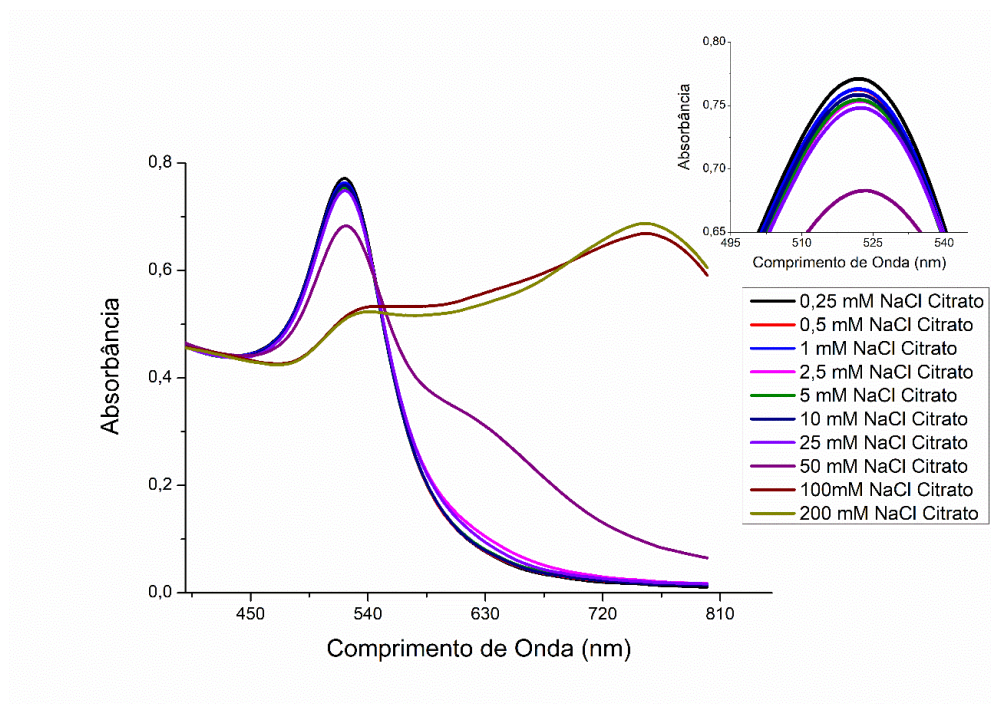


Figura 25: Ensaio de floculação das AuNPs-citrato em diferentes concentrações de sais.

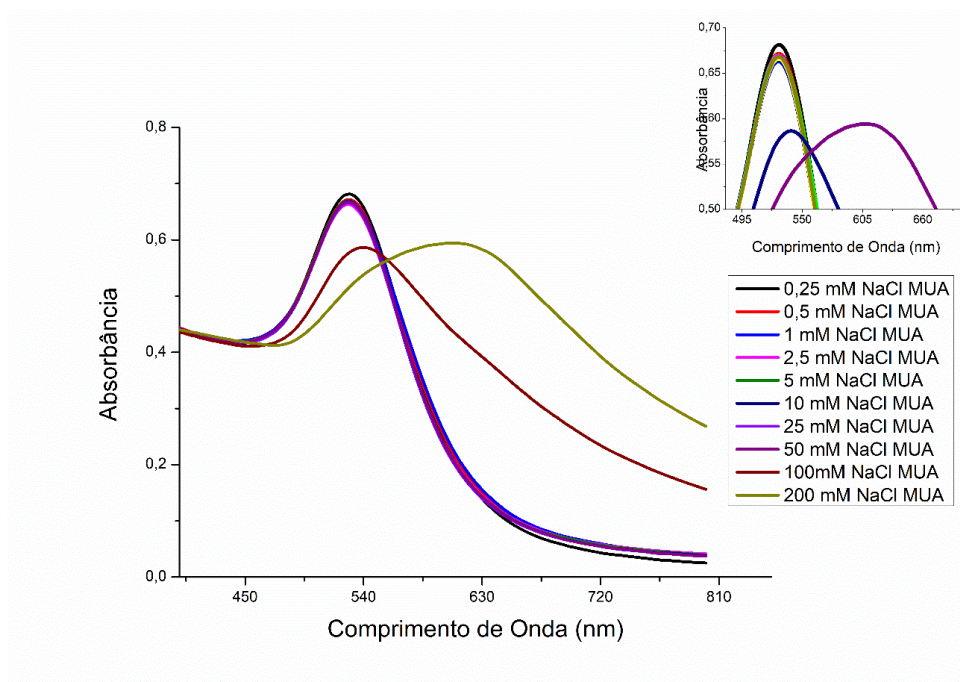


Figura 26: Ensaio de floculação das AuNPs-MUA em diferentes concentrações sais.

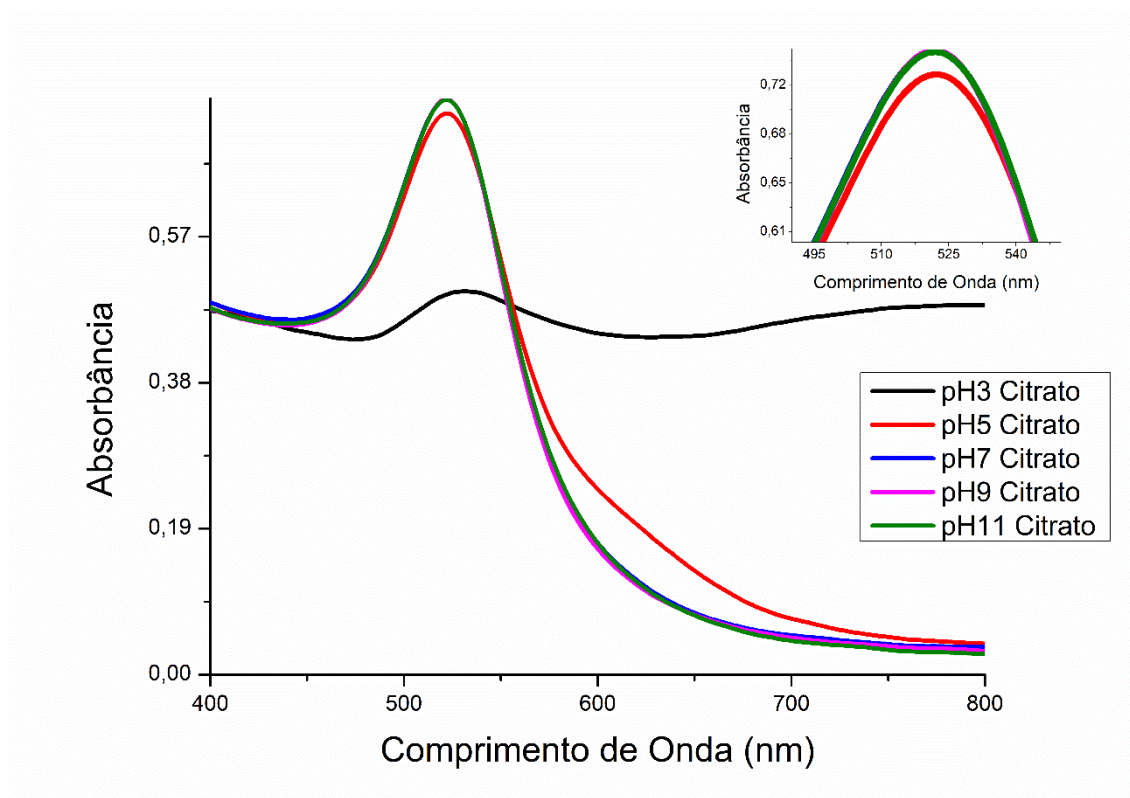


Figura 27: Ensaio de floculação das AuNPs-citrato em diferentes faixas de pH.

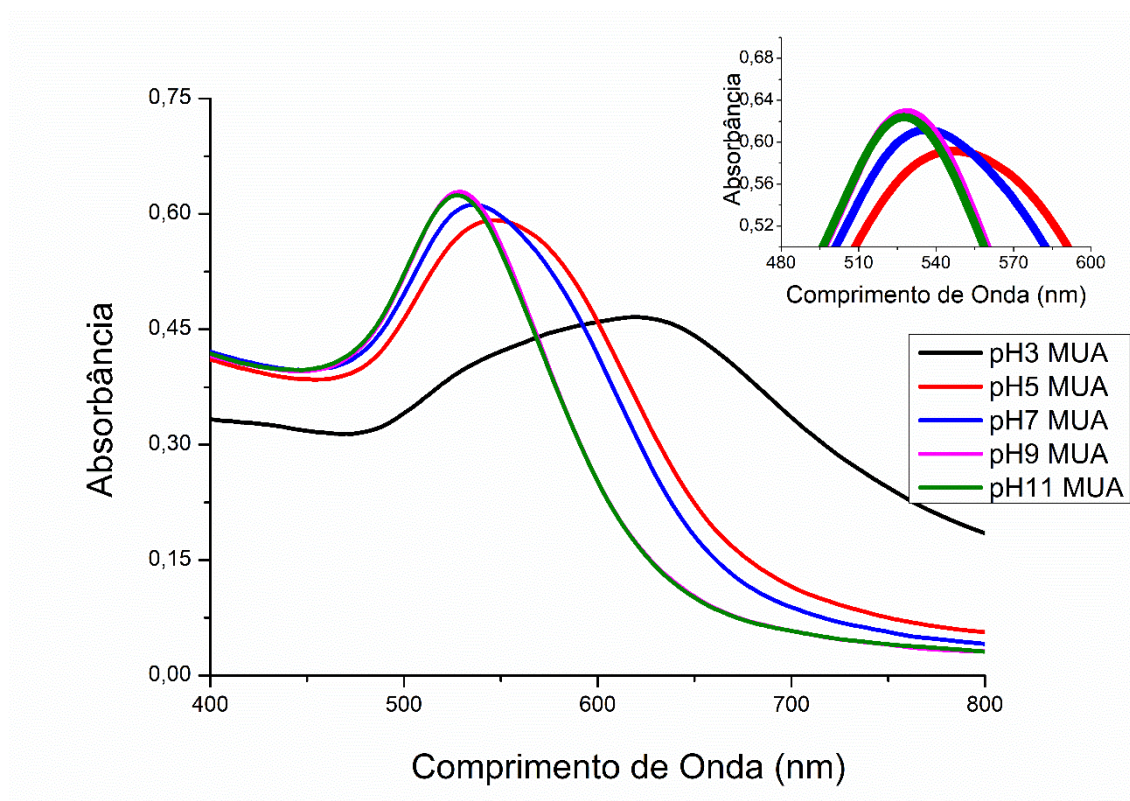


Figura 28: Ensaio de floculação das AuNPs-MUA em diferentes faixas de pH

6. CONCLUSÃO

Este trabalho comprova a viabilidade de produzir nanobioconjugados estáveis feitos de AuNPs-MUA e peptídeos sintéticos oriundo da NS1 dos vírus da Dengue tipo I e IV.

A formação dos bioconjugados foi ratificada através da espectrometria UV-vis, que explora o surgimento das bandas plasmônicas típicas das AuNPs. Para o sistema de modificação das AuNP com MUA, por exemplo, a substituição da superfície metálica foi evidenciada pelo deslocamento hipsocrômico, enquanto os demais ensaios de conjugação com os peptídeos I e IV revelaram deslocamentos batocrômicos.

O tratamento das amostras com centrifugações e lavagens pode interferir nas análises, como demonstrado nas etapas de modificação e outros ensaios de bioconjugação.

É sensato considerar a progressão deste trabalho com vistas a ensaios in vivo, com inoculação em cobaias.

7. REFERÊNCIAS

AH, C. et al. **Gold nanoparticles and method of synthesizing the same** Google Patents, , 2 fev. 2006. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US20060021468>>

AIYEGBO, M. S. et al. Differential accessibility of a rotavirus VP6 epitope in trimers comprising type I, II, or III channels as revealed by binding of a human rotavirus VP6-specific antibody. **Journal of virology**, v. 88, n. 1, p. 469–76, jan. 2014.

AKEY, D. L. et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6173, p. 881–885, 21 fev. 2014.

ALCON-LEPODER, S. et al. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. **Novartis Foundation symposium**, v. 277, p. 233–247, 2006.

ASLAN, K.; GEDDES, C. D. Microwave-Accelerated Ultrafast Nanoparticle Aggregation Assays Using Gold Colloids. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 2131–2136, mar. 2007.

AVIRUTNAN, P. et al. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 1, p. 424–33, 1 jul. 2011.

BEHZADI, S. et al. Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. **Nanoscale**, v. 7, p. 5134–5139, 2015.

BRANDT, W. E. et al. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 105, n. 6, p. 1565–8, dez. 1970.

BRUST, M. et al. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in. **Journal of Chemical Society**, p. 801–802, 2000.

CAO, G. Nanostructures & Nanomaterials. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 66, 2004.

CASCIO, P. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 10, p. 2357–2366, 15

maio 2001.

COLANGELO, E. et al. Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, p. acs.bioconjchem.6b00587, dez. 2016.

CRABTREE, M. B.; KINNEY, R. M.; MILLER, B. R. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 771–786, 4 abr. 2005.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DARNELL, S. et al. Precise Predictions of Linear B Cell Epitopes in Protean 3D. p. 3–6, 2012.

DAS, M. et al. Review on gold nanoparticles and their applications. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, n. 4, p. 193–205, dez. 2011.

DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, abr. 2008.

DING, N. et al. A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg²⁺ detection. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 395, p. 161–167, 2012.

DOANE, T. L. et al. Nanoparticle ζ -Potentials. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 3, p. 317–326, 20 mar. 2012.

FALCONAR, A. K. I. Dengue fever is the most important arthropod-borne viral disease of humans and there has been a global increase in the life-threatening forms of the disease,. **Archives of virology**, v. 142, p. 897–916, 1997.

FAN, X.; ZHENG, W.; SINGH, D. J. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles. **Light: Science & Applications**, v. 3, n. 6, p. e179, 6 jun. 2014.

FARADAY, M. The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. ... **Transactions of the Royal Society of ...**, v. 147, n. 0, p. 145–181, 1857.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1 jan. 1973.

- FUERTES, G. et al. Intelligent Packaging Systems: Sensors and Nanosensors to Monitor Food Quality and Safety. **Journal of Sensors**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- GLAZER, E. S. et al. Biodistribution and acute toxicity of naked gold nanoparticles in a rabbit hepatic tumor model. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 459–468, 21 dez. 2011.
- GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.
- GROMMÉ, M. et al. The rational design of TAP inhibitors using peptide substrate modifications and peptidomimetics. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p. 898–904, abr. 1997.
- GUPTA, S. et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267, 2013.
- GUTSCHE, I. et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 8003–8, 2011.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16055, 18 ago. 2016.
- HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, jun. 2007.
- HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, jan. 2010.
- IMURA, K. et al. Visualization of localized intense optical fields in single gold-nanoparticle assemblies and ultrasensitive raman active sites. **Nano Letters**, v. 6, n. 10, p. 2173–2176, out. 2006.
- JACOBS, M. G. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 11, p. 1603–10, ago. 2000.
- JONES, L. H. Recent advances in the molecular design of synthetic vaccines. **Nature Chemistry**, v. 7, n. 12, p. 952–960, 20 nov. 2015.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6401–8, 1 ago. 2010.

KUMAR, S.; GANDHI, K. S.; KUMAR, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 10, p. 3128–3136, maio 2007.

LANGER, J.; NOVIKOV, S. M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Sensing using plasmonic nanostructures and nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 26, n. 32, p. 322001, 14 ago. 2015.

LE GUÉVEL, X. et al. Nanoparticle size influences the proliferative responses of lymphocyte subpopulations. **RSC Adv.**, v. 5, n. 104, p. 85305–85309, 2015.

LEMES, E. M. B. et al. Circulating human antibodies against dengue NS1 protein: potential of recombinant D2V-NS1 proteins in diagnostic tests. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 32, n. 4, p. 305–12, abr. 2005.

LI, J. et al. Gold nanoparticle size and shape influence on osteogenesis of mesenchymal stem cells. **Nanoscale**, v. 8, n. 15, p. 7992–8007, 2016.

LIM, Y. T. et al. Diagnosis and therapy of macrophage cells using dextran-coated near-infrared responsive hollow-type gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 37, p. 375105, 17 set. 2008.

LIN, S.-W. et al. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **Journal of Infection**, v. 64, n. 3, p. 325–334, mar. 2012.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MESSERSMITH, R. E.; NUSZ, G. J.; REED, S. M. Using the Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles To Monitor Lipid Membrane Assembly and Protein Binding. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 50, p. 26725–26733, 19 dez. 2013.

MU, Q. et al. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7740–7781, 13 ago. 2014.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.

NEEFJES, J.; OVAA, H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 12, p. 769–775, 14 nov. 2013.

OLIVEIRA, J. P. et al. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. **Arabian Journal of Chemistry**, abr. 2017.

PACHECHO, G. Studies on the Action of Metallic Colloids on Immunisation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 18, n. 1, p. 81–149, 1925.

PAPOFF, F.; HOURAHINE, B. Geometrical Mie theory for resonances in nanoparticles of any shape. **Optics Express**, v. 19, n. 22, p. 21432, 24 out. 2011.

PARK, J.-W.; SHUMAKER-PARRY, J. S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 5, p. 1907–1921, 5 fev. 2014.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S30–S37, dez. 2010.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751–760, 2007.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 131, 2016.

RAY, S.; DAS, A. K.; BANERJEE, A. Smart oligopeptide gels: in situ formation and stabilization of gold and silver nanoparticles within supramolecular organogel networks. **Chemical Communications**, n. 26, p. 2816, 2006.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 229, n. 4715, p. 726–33, 23 ago. 1985.

SCATURRO, P. et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005277, 12 nov. 2015.

SHUKLA, R. et al. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. **Langmuir**, v. 21, n. 23, p. 10644–10654, nov. 2005.

SKWARCZYNSKI, M. Recent advances in peptide-based subunit nanovaccines. **Future Medicine**, v. 9, p. 2657–2669, 2014.

SMITH, G. W.; WRIGHT, P. J. Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Dengue Type 2 Virus-infected Vero and Aedes albopictus Cells. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 3, p. 559–571, 1 mar. 1985.

TAM, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, p. 5409–13, ago. 1988.

THOBHANI, S. et al. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. **Journal of Immunological Methods**, v. 356, n. 1–2, p. 60–69, 2010.

TIMKOVICH, R. Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1–2, p. 135–143, maio 1977.

VIGDERMAN, L.; ZUBAREV, E. R. **High-yield synthesis of gold nanorods with optical absorption at wavelengths greater than 1000nm using hydroquinone** United StatesGoogle Patents, , 20 set. 2012. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US20120235095>>

WALLIS, T. P. et al. Determination of the Disulfide Bond Arrangement of Dengue Virus NS1 Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20729–20741, 14 maio 2004.

WILEY, B. J. et al. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 15666–15675, 2006.

WINKLER, G. et al. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, v. 162, n. 1, p. 187–196, jan. 1988.

YEN, H.-J.; HSU, S.; TSAI, C.-L. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553–1561, 3 jul. 2009.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–1057, mar. 2000.

ZHANG. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. **International Journal of Nanomedicine**, p. 771, set. 2010.

ZHANG, J. et al. Two-Dimensional Cysteine and Cystine Cluster Networks on Au(111) Disclosed by Voltammetry and in Situ Scanning Tunneling Microscopy. **Langmuir**, v. 16, n. 18, p. 7229–7237, set. 2000.

ZHANG, Q. et al. Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3, p. 284–295, 17 set. 2011.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3–4, p. 638–665, fev. 2013.

ZHONG, C. J.; NJOKI, P. N.; LUO, J. **Controlled synthesis of highly monodispersed gold nanoparticles** United States Google Patents, , 28 abr. 2009. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US7524354>>

ZONG, J.; COBB, S. L.; CAMERON, N. R. Peptide-functionalized gold nanoparticles: versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications. **Biomater. Sci.**, v. 872, n. 5, 2017.